



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE
BIOENSAYO EN RATÓN PARA LA
DETERMINACIÓN DE SAXITOXINAS EN EL
BIOTERIO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

SIXTO GONZAGA VALENTINA



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Bernardo Lucas Florentino
Vocal	Lucia Gabriela Bascuñan Termini
Secretario	Lucia Cornejo Barrera
1er. Suplente	Inés Miranda Martínez
2do. Suplente	Iliana Elvira González Hernández

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Unidad de experimentación animal (UNEXA) de la Facultad de Química. Conjunto E, Facultad de Química, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F.

Asesor del tema:

Bernardo Lucas Florentino

Supervisor Técnico:

Casimiro Ramírez Camarena

Sustentante:

Valentina Sixto Gonzaga

DEDICATORIAS

A mis padres

Por su cariño, comprensión y apoyo.

Por el esfuerzo y sacrificio hechos para que pudiera terminar una carrera.

A mis hermanos

Por el apoyo y comprensión mostrados en ciertas etapas difíciles de mi vida.

A mis amigos

Por el cariño brindado hasta ahora.

A mis maestros

Por la enseñanza que cada uno dejó en mí.

A la UNAM

Por darme la oportunidad de terminar una carrera.

Por ser un segundo hogar.

RECONOCIMIENTOS

Como sabemos, el trabajo de una tesis es el resultado de la cooperación e interacción con otras muchas personas que nos ayudan, nos inspiran o nos provocan, es por eso que hago los siguientes reconocimientos:

A la Facultad de Química que durante 5 años me brindó un lugar como alumna.

A mi madre y a mi padre por desvelarse estando pendiente de mi llegada a casa, apoyarme siempre y por la educación brindada hasta ahora.

A Pilar por ser un grandioso ser humano y preocuparse por cada uno de los “cabezones”, de igual manera agradezco tus consejos, el cariño, la confianza, el aguante que me tuviste desde que te conocí y la refrescante sonrisa brindada día con día.

Al maestro Bernardo Lucas por el apoyo brindado durante la realización del servicio social, la LABDEA y la tesis. Me tardé pero cumplí con el compromiso, gracias por el tiempo dedicado.

A Lety por colaborar para que este trabajo concluyera adecuadamente no importando lo saturada de trabajo que estuvieras.

Al mejor profesor Rodolfo Fonseca Larios por revivir mi iniciativa, gracias por la confianza.

A mi supervisor técnico el Q.F.B. Casimiro Ramírez y a la I.Q.F. Norma Martínez por el interés y apoyo mostrado para la realización del presente trabajo.

A todos mis amigos gracias por escucharme y brindarme su cariño; Bere, Julio, Uriel, Ramiro, Aldo, Ivon, Gaby, Fanny, Víctor, Laura, Kiomi, Cristal, Monse, Zazú, Las muy salsitas (el mejor equipo de fútbol de la facultad), Omar, Jorge, Oscar, América, Mitzy, María, Iván, Ernesto, Saúl, Yosafat, Zule, Nancy, Samurai, Nallely, Quike, Ibeth, Ale, Diego, Mary, Claudia, Silvia, Bk, Chio, Viry, Edgar, Sonia, Cecilia, Memo, Chispa, Aide, Chabela, Xochitl, Yolo, Tania, Alicia, Rodrigo, Fernando, Carlitos, Diana, Gladis, Cynthia, Rodolfo, Pili, Israel, Luci, Nayeli “La Botana”, Aurora, espero no haber excluido a alguien.

CAPÍTULO 5	
CONCLUSIONES	53
CAPÍTULO 6	
ANEXO A	54
CAPÍTULO 7	
BIBLIOGRAFÍA	57

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

No obstante que el consumo de productos marinos es bajo en el país, es importante poner mayor atención en su seguridad alimenticia, debido a que parte del producto capturado es para exportación y debe cumplir con los requisitos establecidos por las normas del país al cual se va a exportar. Se tiene conocimiento de diversos tipos de intoxicaciones causadas por la ingesta de productos marinos, como son los casos de envenenamiento por consumo del pez globo y de ciertos cangrejos; intoxicación por peces que producen “ciguatera”; envenenamiento paralizante por moluscos (PSP por sus siglas en inglés Paralytic Shellfish Poisoning); intoxicación diarreica por moluscos (DSP por sus siglas en inglés Diarrhetic Shellfish poisoning); por mencionar algunos (1,2).

Para el caso de las intoxicaciones alimentarias tipo PSP la toxinas responsables son las saxitoxinas, que en México son producidas principalmente por dos especies de dinoflagelados: ***Gymnodinium catenatum*** y ***Pyrodinium bahamense var. compressum***, los cuales al multiplicarse masivamente ocasionan mareas rojas nocivas. Las saxitoxinas se bioacumulan por filtración en moluscos bivalvos como ostiones, almejas y mejillones, estos al ser ingeridos por las personas les ocasiona el envenenamiento paralizante, que en su cuadro más agudo puede llegar a ocasionar la muerte (2).

Esta intoxicación, además de los daños a la salud genera impactos económicos negativos causados por la reducción en extracción de recursos marinos, ausencia laboral, menor consumo interno y menor exportación por la pérdida de confianza en dichos productos alimenticios.

Los datos sobre la incidencia de estos fenómenos son escasos y limitados debido principalmente a que se presentan en zonas impredecibles y a la vez una falta de comunicación al público en general sobre los programas de vigilancia sanitarios involucrados en dichos eventos (1).

Con base a lo antes mencionado, es necesario tener conocimiento del riesgo potencial que se tiene por el consumo de ciertos moluscos que pueden producir el envenenamiento tipo PSP, ya en la actualidad las normas oficiales establecen un límite máximo para la presencia de los tóxicos responsables de dicho envenenamiento.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Implementar el bioensayo en ratón para la determinación de saxitoxinas (biotoxinas marinas) implicadas en la intoxicación paralizante por moluscos (PSP), en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Concertar reuniones con personal capacitado en el manejo de la metodología, para apoyar la implementación de la estandarización en las instalaciones de la UNEXA.
- ❖ Montar el proceso de extracción de biotoxinas marinas implicadas en la PSP en un material biológico sospechoso.
- ❖ Realizar la determinación de saxitoxina por medio de bioensayo en ratón en muestras biológicas que cuenten con valores ya determinados por una institución reconocida en dicha determinación.
- ❖ Determinar el nivel de saxitoxinas en muestras sospechosas de la presencia de biotoxinas marinas implicadas en la PSP.

2.1 CONTENIDO NUTRIMENTAL EN MOLUSCOS BIVALVOS

Las cualidades nutricionales son una de las razones del incremento del aprovechamiento de los moluscos, esto por su alto valor nutritivo, ya que contienen vitaminas A, B, C y D; compuestos glicero-fosfóricos, sodio, fósforo, potasio y proteínas de alto valor biológico y bajo contenido en grasas, estas se encuentran en cantidades adecuadas y de fácil digestión. Las proteínas que están presentes son digeribles casi en un 100%, contra el 63% de las de carne de res. Los ostiones junto con otros moluscos, poseen altas cantidades de yodo, compuesto que interviene en el funcionamiento de la tiroides y es escaso en la alimentación: anti-anémicos como el cobre y el hierro, por lo anterior estos productos han adquirido popularidad como alimentos muy nutritivos (3,4).

Aparte de la cantidad y calidad de las proteínas, los moluscos son muy ricos en minerales. Por ejemplo: al mejillón se le atribuyen, comparativamente con otros productos, grandes cantidades de hierro: un total de 4.5 gramos por cada 100 de parte comestible. Este mineral es un elemento fundamental en la producción de hemoglobina por lo que favorece el desarrollo celular. Así mismo 100 gramos de moluscos contienen hasta 200 mg de sodio y 91 mg de calcio, además son ricos en potasio, fósforo, yodo y magnesio. Además, la presencia de ácidos grasos poliinsaturados es fundamental a la hora de evitar la aparición de enfermedades cardiovasculares. En la **tabla 1** es posible comparar algunos de los aportes nutrimentales de este tipo de organismos (3,4).

Tabla 1. **Valor nutritivo de moluscos bivalvos**

APORTE NUTRIMENTAL (100 gramos de peso neto, parte comestible)									
Alimento	Energía (Kcal)	Proteína (g)	Grasa (g)	Calcio (mg)	Fósforo (mg)	Hierro (mg)	Potasio (mg)	Sodio (mg)	Zinc (mg)
Almeja	82	14	0.70	-----	168	3.4	235	36	1.7
Ostión	79	9.4	2.3	91	76	6.3	175	200	74.7

Fuente: Chávez et al. (3)

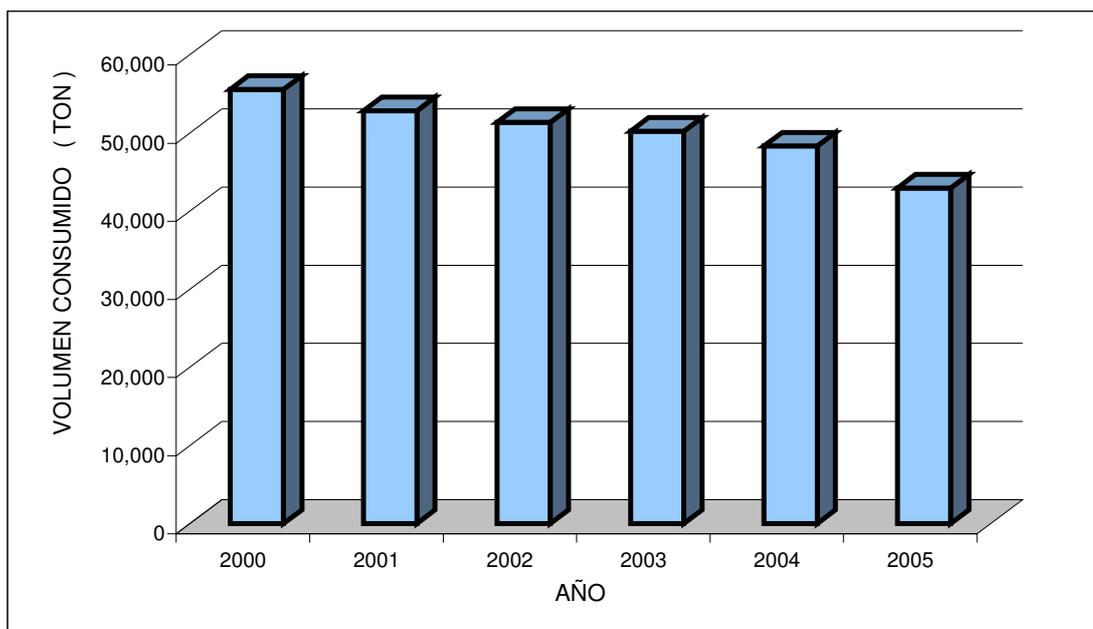
Desde este punto de vista, su consumo está muy recomendado como parte de una dieta sana y equilibrada, sin embargo debido a diferentes factores (precio, sitios de venta, cultura de consumo, etc.) éste ha disminuido notoriamente, por ejemplo, para el año 2000 el consumo *per capita* de ostión fue de 0.77kg y para el 2002 solo de 0.49kg esto representa un serio problema para varios sectores pesqueros involucrados como son; la industrialización, la comercialización y la producción (5).

2.2 PRINCIPALES USOS DE LOS MOLUSCOS

El volumen de producto capturado ha ido disminuyendo año con año, según las estadísticas reportadas recientemente, este comportamiento también se observa en el producto industrializado y el comercializado en fresco (**ver gráficos 1 y 2**). Los gráficos corresponden a ostión y almeja, sin embargo la disminución antes mencionada se generaliza para todo tipo de moluscos bivalvos, no obstante el sector pesquero mexicano es de suma importancia para la economía del país ya que tiene una importante participación como exportador de este tipo de producto (5).

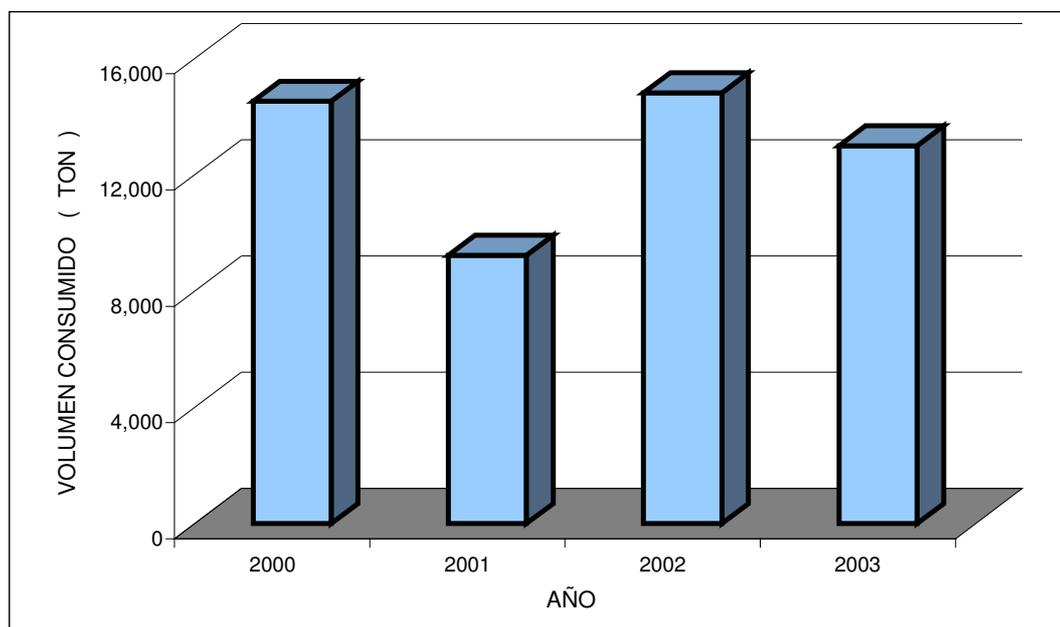
Los moluscos destinados a la industria, en su mayoría son enlatados y solo una pequeña parte se deshidrata para elaboración de sopas.

Gráfico 1. **Producción nacional de ostión**



Fuente: Anuario estadístico pesquero (2000 – 2005)

Gráfico 2. Producción nacional de almeja.



Fuente: Anuario estadístico pesquero (2000- 2003)

Las principales especies de almeja que se explotan en el Océano Pacífico y el Golfo de México son: la "almeja chocolata" (*Megapitaria aurantiraca*), "almeja catarina" (*Argopecten circularis*), la "almeja roñosa" (*Chione undatella*), la "almeja blanca" (*Rangia flexuosa*), la "almeja pismo" (*Tivela stultorum*), la "almeja voladora" (*Pecten* sp) y la "almeja gallito" (*Rangia cunneata*).

El sector pesquero se ve afectado cuando se detecta la formación de una marea roja debido a que el consumidor adquiere desconfianza por el producto, provocando decaimiento en el volumen capturado, ausencia laboral, menor consumo interno y menor exportación.

De acuerdo a los datos reportados por la SAGARPA - INEGI en el periodo de 1999 al 2005, el volumen de exportación mexicana es económicamente significativo, de tal manera que si llegara a interrumpir dicha actividad se tendrían pérdidas económicas altas. México, al ser exportador debe cumplir con las normas de salud establecidas en cada país principalmente para no afectar la salud del consumidor (5).

2.3 FLORACIONES ALGALES NOCIVAS

Las algas planctónicas que configuran el componente vegetal del plancton, el fitoplancton, son los responsables de más del 90% de las sustancias orgánicas marinas y representan una amplia diversidad de tallas y formas. Estos organismos se alimentan con ayuda de la fotosíntesis, un proceso compartido por macroalgas y las plantas superiores, en el que la materia orgánica se forma a partir de sustancias inorgánicas simples como el agua y el dióxido de carbono, empleando para ello energía solar y generando oxígeno. Por ello constituyen la base de la cadena trófica marina y proveen el oxígeno esencial a toda la vida en el mar (1).

El fitoplancton está distribuido en todo el planeta, particularmente en la fracción de la columna de agua que recibe la luz, siendo más abundante en las zonas costeras que en las oceánicas abiertas.

De las 4000 especies marinas del fitoplancton microscópico viviente alrededor de 300 pueden proliferar en tan alto número que alcancen densidades de millones de células por litro de agua, de éstas últimas solo son tóxicas alrededor de 60 especies. La alta densidad de microalgas puede modificar la coloración del agua, a dichos fenómenos se les ha dado diferentes nombres, entre los que se encuentra el de “mareas rojas”, por la particular coloración rojiza producida por algunas especies, sin embargo el término más apropiado para su denominación es “floraciones de algas” o “proliferaciones algales”(1,2).

Estos fenómenos pueden ser beneficiosos para la acuicultura y la producción de los recursos marinos que se alimentan de dichos organismos (peces, moluscos y crustáceos). También son utilizados en el aislamiento y la purificación de compuestos químicos naturales de uso farmacéutico.

No obstante, son numerosos los casos de floraciones de algas que han sido asociadas a severas intoxicaciones y muerte de seres humanos, de mamíferos, aves y peces. Entre los principales organismos causantes de floraciones algales nocivas se encuentran los dinoflagelados, las diatomeas y cianobacterias. Las especies antes mencionadas producen en su metabolismo compuestos químicos de muy alta toxicidad nombradas toxinas marinas. Estas sustancias, en su mayoría son resistentes al calor de la cocción habitual y

pueden interferir, en muy bajas concentraciones, con procesos fisiológicos normales como la conducción de impulsos nerviosos, la absorción de agua y de alimentos en el intestino o el procesamiento de la memoria (6,7,8).

2.3.1 DINOFLAGELADOS PRODUCTORES DE TOXINAS

Los dinoflagelados son principalmente organismos unicelulares móviles propulsados por flagelos. Los dinoflagelados en general viven como células aisladas, tienen forma esferoidal y su diámetro mayor varía desde 5 micrómetros hasta 2mm. Poseen un flagelo que nace desde la hendidura transversal que corresponde a su “cintura” y otro longitudinal que se aloja en la hendidura longitudinal (sulcus). El movimiento coordinado de estos flagelos les otorga un movimiento natatorio característico en espiral. Aproximadamente la mitad de ellos poseen cloroplastos, organelos con los que pueden desarrollar fotosíntesis y ser autótrofos. El resto de los dinoflagelados que no tiene cloroplastos incorporan materia orgánica en suspensión o fagocitan bacterias u otros flagelados (9).

La mayoría de los dinoflagelados, incluyendo a las especies tóxicas, pueden reproducirse por división simple (asexuada) con relativa lentitud (desde dos veces por día hasta una vez cada cinco días). Esto permite que de unas pocas células en el medio natural se llegue a producir una floración masiva al cabo de pocos días.

En condiciones desfavorables muchos dinoflagelados entran en fase de vida latente con la formación de quistes, cuando las condiciones cambian (condiciones favorables de temperatura, luz y nutrientes), los quistes germinan, al abrirse el quiste, emerge una célula, ésta se reproduce por división simple. Si las condiciones siguen siendo favorables, las células seguirán reproduciéndose exponencialmente originando cientos de células. De llegar a dividirse todas las células de igual forma y al mismo ritmo, se puede generar una floración algal nociva con la probable afectación a los recursos marinos.

Cuando las condiciones óptimas desaparecen el crecimiento se suspende y se forman 2 gametos, que se van a juntar para formar un cigoto, éste a su vez forma un quiste, el cual cae al fondo del océano y puede ser capaz de germinar en los próximos años (9,10).

Hay que resaltar que el desarrollo de estas proliferaciones no solo ocurre de manera natural, varios factores que son consecuencia de la acción humana moderna que superponen, desde hace pocos decenios, a los ciclos climáticos globales y pueden estar favoreciendo un aumento significativo en la frecuencia, intensidad y extensión geográfica de los florecimientos algales.

Uno de estos factores es la descarga de nutrientes exógenos a las aguas costeras provenientes de desechos urbanos acuícolas e industriales, los cuales han alterado las condiciones ambientales de crecimiento de las microalgas y otros componentes del plancton (eutrofización).

La proliferación de algas nocivas también pueden ser ocasionadas por la ruptura de las cadenas alimentarias marinas provocadas por la sobre pesca, el incremento de la movilización de metales traza esenciales para el crecimiento de las microalgas o inhibidores del mismo, los depósitos atmosféricos (concretamente el agua de lluvia con compuestos de nitrógeno) y la acuicultura intensiva en algunas zonas marinas especialmente vulnerables (8,9).

Las microalgas tóxicas tienen la capacidad de producir en su metabolismo compuestos bioactivos hidro o liposolubles que pueden presentar efectos hemolíticos, neurotóxicos o enterotóxicos dependiendo de su estructura, estado de conversión, dosis y susceptibilidad del consumidor, sea este humano o animal.

2.4 EFECTO DE LAS TOXINAS SOBRE EL ORGANISMO

Las biotoxinas que son producidas por los dinoflagelados son concentradas por los moluscos bivalvos ya que se alimentan filtrando grandes volúmenes de agua lo que les permite obtener y concentrar apreciables cantidades de organismos componentes del plancton, incluidos los tóxicos. Como consecuencia de la continua filtración de plancton tóxico, grandes cantidades del veneno se ligan a los tejidos o se concentran en las glándulas digestivas. Las toxinas pueden ser transmitidas al hombre a través del consumo de productos del mar y convertirse en un serio riesgo como se muestra en la **figura 1** (11, 12).

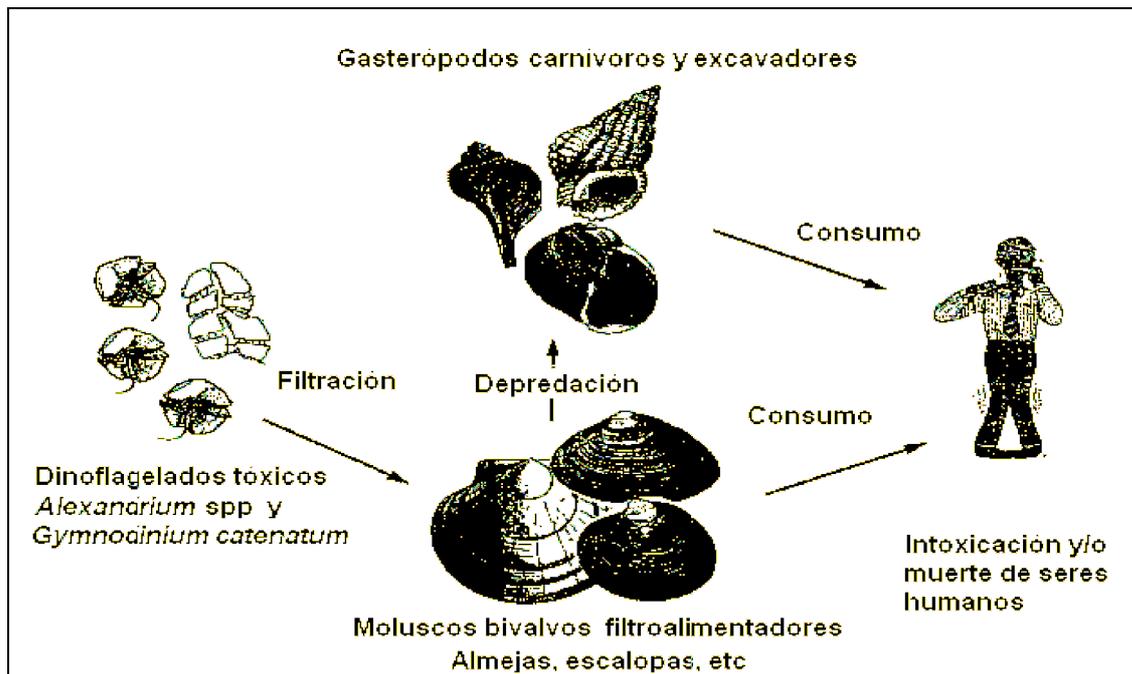


Figura 1. Escenario que ilustra como las toxinas paralizantes pueden ser acumuladas por los moluscos y llegar a causar intoxicación a los seres humanos.

Las toxinas marinas afectan principalmente dos propiedades metabólicas esenciales en las células de los seres vivos. En primer lugar alteran la permeabilidad de las membranas, esto es, la propiedad fisiológica de dejar pasar selectivamente a los iones de importancia (sodio, potasio, calcio o cloruro), a ciertos nutrientes y al agua. En segundo lugar, afectan la intercomunicación entre las células en vertebrados al unirse con alta afinidad a los sitios receptores presentes en proteínas de membrana (receptores y canales iónicos) o enzimas del citosol, alterando en todos los casos su funcionamiento normal (14).

Las toxinas paralizantes, neurotoxinas y ciguatéricas alteran específicamente el transporte del ión sodio, pues son capaces de unirse fuertemente a la proteína de la membrana denominada canal de sodio que está presente, con pequeñas variaciones estructurales, en casi todas las células de aves, mamíferos, peces y anfibios y también en invertebrados como los moluscos bivalvos. Son numerosas las toxinas capaces de unirse al canal de sodio y afectar su funcionamiento. Estas toxinas se dividen en toxinas bloqueadoras del canal que impiden el paso de los iones sodio, entre las que se encuentran las saxitoxinas, las tetrodotoxinas y toxinas de caracoles marinos, y en las activadoras, que favorecen el paso de los iones sodio a niveles superiores a los que ocurren en estado fisiológico normal, causado por la brevetoxina, ciguatoxina y toxinas de anémonas (7,9,13).

2.5 FORMAS DE INTOXICACIÓN

Las toxinas de microalgas nocivas pueden llegar a afectar la salud humana de diversas formas y grados según la vía a la que se expongan las personas, estas son:

Contacto directo: Esta vía de afectación se da cuando la marea roja se presenta en zonas de pesca o lugares de recreación y las personas que realizan esas actividades, entran en contacto directo con esas aguas dando como resultado irritación en la piel, mucosa nasal, ocular o dermatitis en general; en todos los casos estas no pasan de ser molestias leves que no requieren tratamiento especializado.

Contacto indirecto: Las personas pueden ser afectadas por las toxinas marinas por medio de un vector, que generalmente son los moluscos bivalvos, ya que estos tienen la capacidad de concentrar grandes cantidades de microorganismos, por esto cuando se presenta la marea roja en un banco ostrícola, los organismos concentran grandes cantidades de toxinas, y si en ese lapso se ingieren por personas, éstas resultarán intoxicadas. Este tipo de intoxicación es la más peligrosa ya que puede causar desde molestias leves hasta la muerte, lo que depende de muchos factores, entre ellos la constitución física del individuo, el estado de salud, el tipo de toxinas, así como la cantidad ingerida (1).

2.5.1 PRINCIPALES TIPOS DE INTOXICACIÓN

Las principales intoxicaciones producidas por las microalgas, descritos hasta la fecha y que afectan directamente al hombre son: Intoxicación Amnésica por Moluscos (ASP = Amnesic Shellfish Poisoning), Intoxicación Diarreica por Moluscos (DSP = Diarrhetic Shellfish Poisoning), Intoxicación Neurotóxica por moluscos (NSP), Ciguatera o Intoxicación Ciguatérica por Pescado (CFP) e Intoxicación Paralizante por Moluscos (PSP = Paralytic Shellfish Poisoning).

Intoxicación Amnésica por Moluscos (ASP)

Es debida al ácido domoico, producido por las diatomeas del género *Pseudonitzschia*. En dosis bajas, este compuesto origina trastornos gastroentéricos, en dosis más elevadas puede ocasionar una lesión grave a células cerebrales provocando síntomas neurológicos

que incluyen la pérdida de memoria. El ácido domoico interrumpe la transmisión neuroquímica normal en el cerebro fijándose a los receptores de glutamato, hecho que causa la mayor excitación de las neuronas y la rotura final de las células. Por esta razón, es una toxina nociva que puede provocar la muerte cuando se ingiere en dosis elevadas. Los síntomas incluyen náuseas, vómitos, espasmos abdominales, diarrea, pérdida de equilibrio, vértigo y pérdida de memoria. En la mayoría de los casos, los síntomas son ligeros y desaparecen a las 24 horas, pero en algunos pacientes de edad avanzada los efectos han persistido durante varios meses (11, 14, 15).

Intoxicación Diarreica por Moluscos (DSP)

Es provocada por el ácido okadaico, este compuesto es producido por dinoflagelados del género *Dinophysis*. Los síntomas aparecen de 30 minutos hasta 12 horas después del consumo de moluscos contaminados. Los pacientes presentan diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal y escalofríos. Las víctimas se recuperan dentro de los 3 a 4 días siguientes a la intoxicación, sin dejar secuelas.

Intoxicación Neurotóxica por Moluscos (NSP)

Producida por el dinoflagelado *Karenia brevis*. Esta intoxicación esta causada por las brevetoxinas de las que han sido diferenciadas por lo menos nueve. Las toxinas actúan fijándose a los nervios y abriendo los canales de los iones de sodio en circunstancias en las que normalmente estarían cerrados, originando varios efectos neurotóxicos en las personas.

Los síntomas aparecen poco después del consumo del molusco tóxico y generalmente remiten en un plazo de horas. Se caracteriza por la aparición de hormigueo y entumecimiento de los labios, de la lengua, de la garganta y de la zona perioral, dolores musculares, trastornos gastrointestinales y vértigo, raramente es fatal (9).

Ciguatera o Intoxicación Ciguatérica por Pescado (CFP)

Es provocada por ciguatoxinas que son producidas por *Gambierdiscus toxicus*, un dinoflagelado que habita adherido a los corales y macroalgas, de ahí es ingerido por peces

herbívoros. El envenenamiento resulta de la ingestión de pescados de aguas tropicales o cálidas alimentados con este dinoflagelado. Afecta el sistema gastrointestinal, cardiovascular y el sistema nervioso. Los síntomas pueden durar de 2 a 3 días o persistir por semanas y la recuperación puede tomar meses o incluso años. En circunstancias fatales la muerte puede producirse por colapso nervioso.

2.5.2 Intoxicación Paralítica por Moluscos (PSP)

Este tipo de envenenamiento es causado por el grupo de las saxitoxinas (STX), que alteran específicamente el transporte del ion sodio que está presente en casi todas las células de mamíferos, aves, peces y anfibios, y también en invertebrados. Así, el bloqueo de los canales del ión daña el funcionamiento celular, inhibiendo las señales eléctricas que mantienen trabajando toda la actividad nerviosa superior, vegetativa y la comunicación sináptica. Los moluscos no son afectados por las toxinas paralizantes, porque muchos de ellos tienen nervios y músculos que trabajan con canales de calcio (11).

Los dinoflagelados responsables de la producción de toxinas paralizantes, en México, son las siguientes especies: ***Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamense var. Compressum***.

2.5.3 EVENTOS SOBRE INTOXICACIONES TIPO PSP

El primer caso de intoxicación humana por consumo de moluscos tóxicos reportado, se produjo el 15 de junio de 1793 en la costa oeste de los Estados Unidos y fue descrito por el capitán George Vancouver en "*A Voyage of Discovery to the North Pacific Ocean, and Round the World*", publicado en 1798. Durante los dos siglos posteriores en esa zona, incluyendo Alaska, se han registrado numerosos casos de envenenamiento que causan la muerte por parálisis respiratoria.

En julio de 1927 se produjo una intoxicación masiva en San Francisco que causó la muerte con severos síntomas paralizantes, de varias personas. Esto estimuló el inicio de los primeros estudios sistemáticos dirigidos por Karl Friedrich Meyer y Hermann Sommer, investigadores de la universidad de California. Los trabajos de Sommer y sus asociados mostraron una relación directa entre la toxicidad de los moluscos y la densidad de una

microalga denominada *Gonyaulax catenella* (hoy conocida como *Alexandrium catenella*) (14).

En México, uno de los primeros casos de esta intoxicación ocurrió en Mazatlán, Sinaloa en 1979. A la fecha este envenenamiento es el más peligroso, causando un porcentaje aproximado del 72% de los brotes de envenenamiento por comida marina que ha ocurrido en la última década. Tres de estos eventos representan 87% de los casos de envenenamiento (460 individuos intoxicados, 32 muertes), siendo Mazatlán, Guerrero y Oaxaca las áreas más afectadas.

El 15 de agosto de 2001 se reportó una mortandad de peces en las costas del estado de Chiapas. La PROFEPA tomó muestras de agua y de organismos en esta zona, y fueron remitidas para su análisis al CIBNOR, quien determinó que la muerte de los peces fue causada por un dinoflagelado *Pyrodinium bahamense*, por lo que el Comité de Prevención y Contingencias de Aguas Marinas del Estado de Chiapas determinó suspender la captura, comercialización y consumo de moluscos bivalvos. El 7 de Septiembre, la Secretaría de Salud en Oaxaca reportó niveles de toxicidad cercanos al límite permisible y convocó al Comité de Vigilancia Sanitaria de Marea Roja, donde se determinó la prohibición de captura, comercialización y consumo de moluscos bivalvos. A pesar de las estrictas medidas de control establecidas para atender la contingencia de marea roja, el 11 de Octubre de 2001 se reportó la muerte por intoxicación de dos menores en Pijijiapan, Chiapas, y el 31 de octubre (del mismo año) la muerte de tres menores en Pinotepa por la ingestión de una especie de mejillón (10).

2.6 TOXINAS RESPONSABLES DE PSP

Las toxinas PSP son un grupo de 21 tetrahidropurinas. Estos compuestos están formados por un anillo de perhidropurina y dos de guanidina como se muestra en la **figura 2**, se dividen en cuatro grupos:

- ❖ Carbamato en el que tenemos la saxitoxina, neosaxitoxina y las gonyautoxinas del uno al cuatro.
- ❖ N-sulfo-carbamoil en el que están la gonyautoxina cinco y seis y gonyautoxina C1, C2, C3 y C4.

- ❖ Decarbamoil (dc) en este están las mismas que las del grupo uno pero en lugar de un grupo carbamato tenemos un grupo hidroxilo.
- ❖ Desoxidecarbamoil (do). Tenemos do-saxitoxina, do-neosaxitoxina, do-gonyautoxina 1.

Su actividad tóxica se encuentra en el grupo dihidroxi del anillo heterocíclico de cinco carbonos (14).

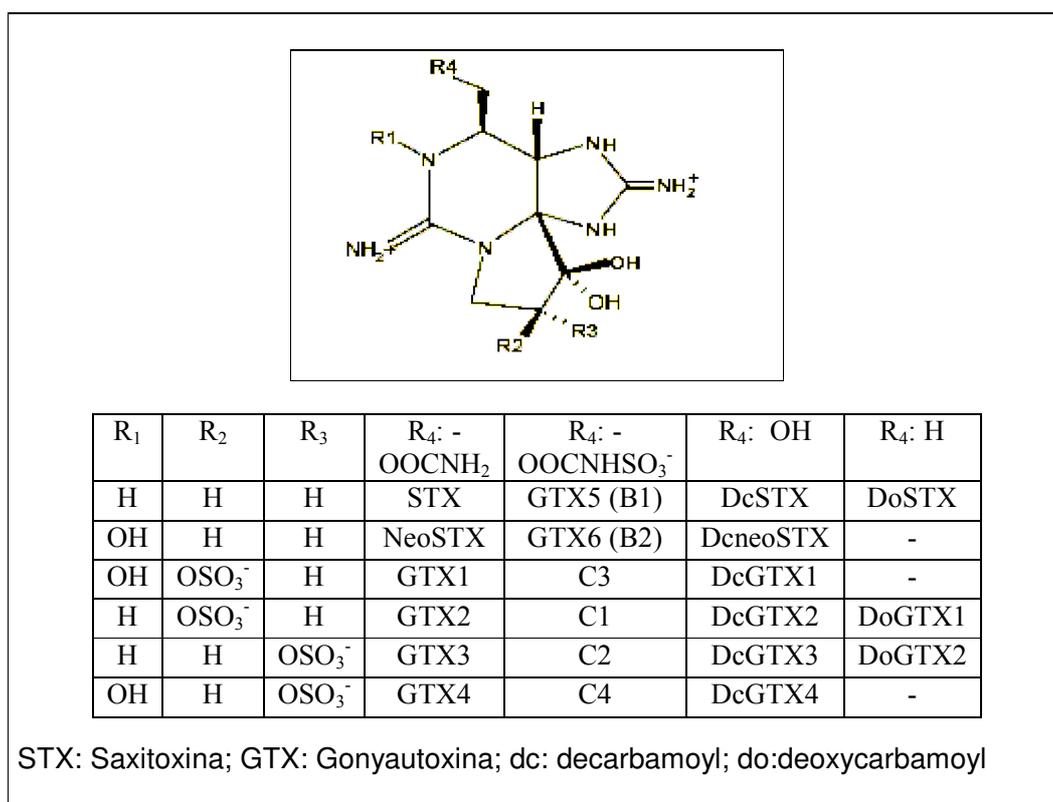


Figura 2. **Clasificación de las toxinas responsables del envenenamiento paralítico por moluscos.**

Del grupo de toxinas mencionado, la saxitoxina (STX) es la mas tóxica y la primera que se sintetizó (1975). Se caracteriza por ser termoestable y por tanto no es afectada durante la cocción del alimento que la contiene; es estable en soluciones ácidas y es soluble en agua; se absorbe fácilmente en el tubo digestivo y a nivel de las mucosas orales y gastrointestinales, es 50 veces más activa y 100 veces mas potente que la estricnina (6,9).

De sus características fisicoquímicas destacan su gran propiedad higroscópica, por lo que su estructura más estable es en forma de clorhidrato, poco soluble en metanol y ácido

acético glacial, se descompone muy rápido en soluciones alcalinas, su peso molecular es de 299.3 como sal pura deshidratada (**ver figura 3**).

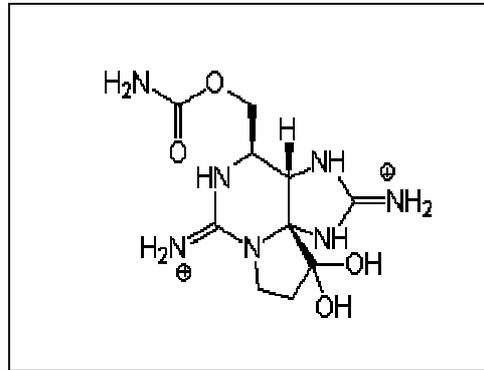


Figura 3. Estructura de la saxitoxina

Es un agente de bloqueo axonal de extraordinaria potencia y bloquea en concentraciones bajas específicamente el transporte de sodio que interviene en la generación del potencial de acción de membranas excitables, actúa directamente sobre el sistema nervioso periférico y músculo esquelético (1).

2.7 MODO DE ACCION EN EL ORGANISMO

Todas las células de los organismos eucariotes, entre los que se encuentran mamíferos y aves, poseen una membrana externa encargada de envolver al citoplasma que contiene al núcleo y a otros organelos que cumplen funciones especializadas. Las células del ser humano tienen diversas funciones, entre las cuales encontramos la contracción muscular en los músculos esqueléticos y cardiacos, la secreción de hormonas en las glándulas endo- y exocrinas, el transporte de solutos para su asimilación en el intestino o para su eliminación en el tejido renal o la percepción de la luz y el sonido y la transmisión de los impulsos nerviosos (8,9).

En esta gran diversidad de funciones celulares se distinguen unos componentes estructurales proteínicos de la membrana celular que son comunes en todas las células. Estos componentes son proteínas de alto peso molecular que están alojados en la membrana externa y tienen como función poner en contacto el exterior de la célula con su interior.

Los receptores y los canales iónicos forman parte de los componentes antes mencionados. Los receptores son proteínas capaces de distinguir y unir a su estructura compuestos químicos específicos que circulan naturalmente en el medio externo celular. Entre los que se encuentran hormonas como la insulina o la adrenalina y neurotransmisores como la acetil colina y el ácido glutámico.

Esta interacción en donde el ligando reconoce un sitio de unión produce en la proteína receptora minúsculos cambios estructurales (cambios conformacionales), los cuales pueden ocasionar otros cambios importantes en la propiedades de las células, como la activación de una reacción química interna o la apertura de un poro o canal microscópico que deja pasar iones, agua o nutrientes.

En el caso de la intoxicación paralizante por moluscos se produce el bloqueo del canal de sodio (**ver figura 4**), esto acarrea como consecuencia la inhibición de los potenciales de acción que son las señales eléctricas que mantienen en funcionamiento la actividad nerviosa superior, vegetativa y la comunicación sináptica, ocasionando una parálisis general en el sistema nervioso central. En ausencia de apoyo respiratorio intensivo, la muerte ocurre por parálisis respiratoria (9,11).

Los efectos cardiovasculares de la SXT son debidos a la resistencia periférica. El corazón no se afecta directamente, no hay mucha contribución del sistema nervioso central, cuando las toxinas del tipo PSP, son absorbidas a través del tracto gastrointestinal, se distribuyen uniformemente en el agua corporal. Los efectos vasculares periféricos consisten en una vasodilatación por efecto de la musculatura vascular, así como de una disminución del tono vasomotor, seguida de un bloqueo de nervios vasoconstrictores; además la STX bloquea los nervios vasoconstrictores antes que los nervios vasodilatadores. Por lo anterior, la STX está entre los agentes hipotensores más potentes, 2-3 µg/kg inyectados vía intravenosa producen una caída de la presión arterial de cerca del 50% del nivel normal.

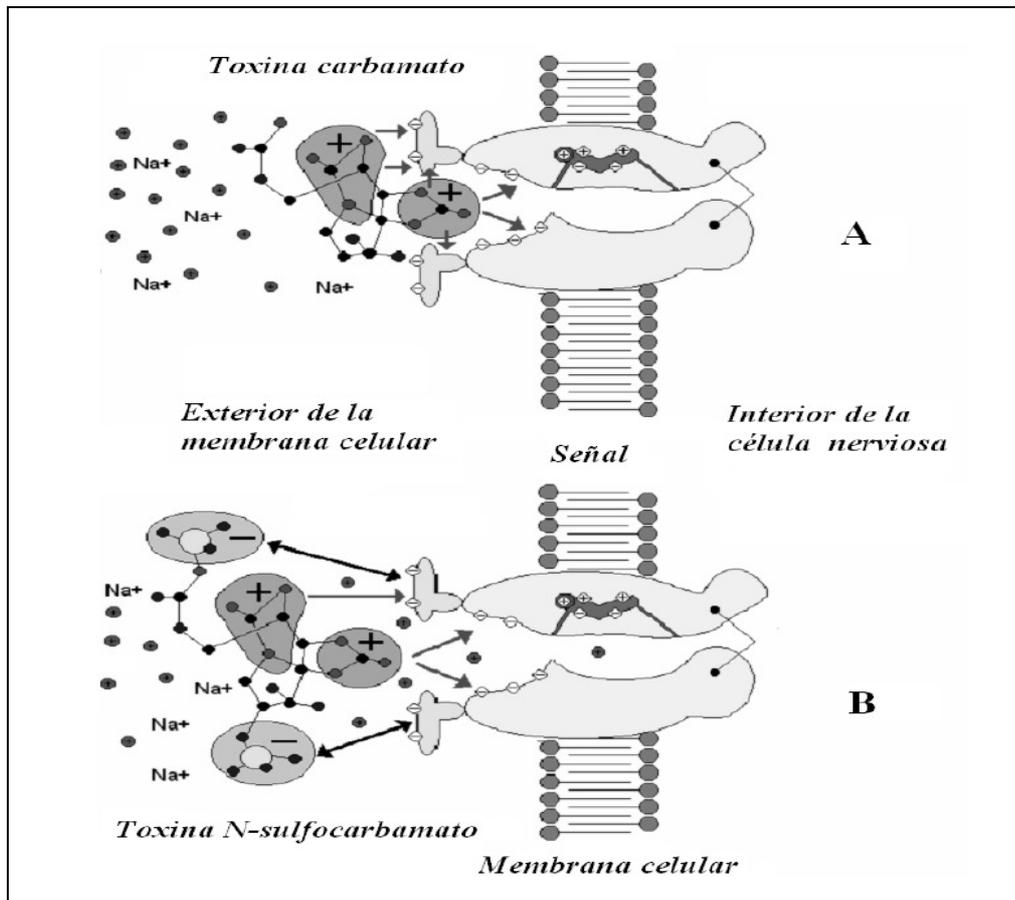


Figura 4. **Mecanismos de acción de las toxinas paralizantes, donde se muestra el bloqueo de los canales de sodio a nivel de membrana celular.**

Sin embargo ¿Por qué los moluscos no presentan efectos tóxicos aparentes?, esta interrogante no ha sido del todo aclarada. Los estudios sobre los efectos fisiológicos de las toxinas marinas son escasos y los de mayor interés fueron realizados por la fisióloga norteamericana Betty M. Twarog entre 1967 y 1975. En estas investigaciones se descubrió que los nervios de los ostiones *Placopecten magallanicus* eran insensibles a la aplicación de altas concentraciones de saxitoxina y tetrodotoxina (0.1mg/mL), las que en vertebrados superiores habrían causado el total bloqueo de los impulsos nerviosos. Por el contrario, otra especie de bivalvo, la ostra *Crassostrea virginica*, mostró una sensibilidad muy alta y los impulsos nerviosos fueron bloqueados por la saxitoxina, mientras que la almeja *Mya arenaria* tuvo una sensibilidad intermedia. La explicación todavía parcial de estas observaciones tuvo que esperar unos 15 años cuando se descubrió que existen canales de sodio de muy diferente afinidad por saxitoxinas y tetrodotoxinas y que en moluscos la

excitabilidad de nervios y músculos depende de flujos de calcio a través de canales de calcio que son insensibles a las toxinas paralizantes (11).

2.7.1 SINTOMATOLOGÍA

Los reportes acerca del tiempo que tardan en presentarse las primeras manifestaciones de intoxicación desde la ingesta de los productos afectados varía de 15 minutos hasta algunas horas. El grado de intoxicación se clasifica en leve, severa o extrema, cuyos principales signos y síntomas se presentan a continuación:

Intoxicación leve: Las manifestaciones que se presentan en este grado de intoxicación son una parestesia peribucal, a lo cual la persona afectada refiere como sensación de “hormigueo” alrededor de la boca, que al paso de los minutos se percibe en manos y pies, en muchos casos en la cara y el cuello; también se presenta una ligera sensación de malestar de la cabeza y náuseas.

Intoxicación severa: Se alcanza este grado de intoxicación cuando la persona afectada presenta el cuadro clínico de intoxicación leve, más lo siguiente: incoordinación al hablar, parestesias en brazos y piernas, incoordinación de extremidades, adinamia, alteración del pulso y dificultad respiratoria.

Intoxicación extrema: este caso grave de intoxicación se presenta, cuando se manifiestan los grados anteriores además de parálisis muscular flácida, disnea pronunciada y en los casos de mayor gravedad, la que depende de la cantidad de mariscos consumidos, puede llevar a la muerte por parálisis respiratoria, en el lapso de 2 a 10 horas(1, 9, 11).

2.7.2 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El diagnóstico de la intoxicación paralizante por moluscos se debe basar en el antecedente de la ingestión de los mismos en las últimas horas o minutos antes del inicio de las molestias. La exploración física debe enfocarse a los trastornos neurales, neuromusculares y digestivos. La disnea o dificultad respiratoria puede ser atribuida a la parálisis parcial de los músculos respiratorios, lo cual indica una intoxicación severa que requiere tratamiento hospitalario de urgencia.

Como tratamiento, se deben administrar medicamentos que contribuyan a retardar o impedir la absorción de las toxinas, para lo cual se recomienda utilizar suspensiones antiácidas a base de hidróxido de aluminio o magnesio, bloqueadores de la secreción gástrica, carbón activado, además de vigilar los signos vitales y en general tratamiento sintomático.

Tratamiento médico de urgencia: Este tratamiento se debe llevar a cabo a nivel hospitalario, y las medidas a tomar en la unidad de urgencias son: eliminar el molusco ingerido mediante lavado gástrico o provocar el vómito; mantener permeables las vías respiratorias; tratar la insuficiencia respiratoria; controlar los signos vitales y mantener en alerta el equipo de resucitación (1,5).

2.7.2.1 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El envenenamiento causado por los pesticidas de anticolinesterasa puede ser un diagnóstico diferencial difícil, especialmente si las víctimas del envenenamiento de anticolinesterasa no son vistas hasta que la fase inicial del estímulo colinérgico ha pasado. Las manifestaciones gastrointestinales como náusea, arqueo, vómito y diarrea, pueden ser confundidas por síntomas similares producidos por el envenenamiento paralizante, pero en el envenenamiento por anticolinesterasa los síntomas gastrointestinales se mejoran después de administrar atropina. Otra evidencia es la estimulación colinérgica, como salivación excesiva, lagrimeo y secreción bronquial, así como miosis pupilar; esto ayuda a diferenciarla del PSP. En la intoxicación por pesticidas anticolinesterasa, la parálisis muscular resulta de una acumulación de acetilcolina y como resultado da la desensibilización de receptores colinérgicos nicotínicos (13).

El envenenamiento por consumo de pez globo es otra forma de envenenamiento por comida marina que debe ser diferenciado del PSP. El agente responsable es la tetrodotoxina y el inicio es agudo, generalmente progresivo y dominan las manifestaciones neurológicas virtualmente idénticas al envenenamiento paralizante. Aunque la alta incidencia de esta intoxicación ocurre en Japón, hay casos esporádicos en otras regiones. La toxina responsable es químicamente diferente a las toxinas de tipo PSP, pero tienen una acción común ya que ambas bloquean los canales de sodio de nervios, músculos y

otras membranas excitables. El diagnóstico diferencial está basado en el antecedente de haber comido pez globo.

El botulismo, envenenamiento causado por la toxina producida por la bacteria ***Clostridium botulinum***, también provoca parálisis flácida. La lesión farmacológica específica es en el nervio activado por la liberación de acetilcolina en todas las uniones colinérgicas y hay evidencia de extensa falla colinérgica.

La ciguatera, es una intoxicación que ocurre como resultado del consumo de pescado más que de moluscos, sin embargo es necesario descartarla. Como la saxitoxina, la ciguatoxina afecta los canales de sodio, pero en el caso de la ciguatoxina la permeabilidad se aumenta. La parestesia (caracterizada por sensaciones anormales en la piel) es el signo clínico predominante en la ciguatera, la diferencia con en envenenamiento paralizante puede ser difícil en pacientes que han consumido una mezcla de comida marina. No existe una prueba diagnóstica de laboratorio, sin embargo, si existe alguna sospecha el examen de agua para identificar la presencia de algas tóxicas (11).

2.8 MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Desafortunadamente la detección de productos del mar contaminados o no aptos para consumo no puede hacerse en el lugar por los pescadores o consumidores, sino que, para estar seguros de que son seguros toxicológicamente hablando, debe hacerse el análisis en un laboratorio químico correctamente equipado.

Entre los métodos conocidos a la fecha se pueden distinguir: ensayos biológicos o bioensayos, ensayos bioquímicos y técnicas analíticas cuantitativas.

Las principales toxinas de origen fitoplanctónico, que tienen efecto sobre el hombre, pueden detectarse mediante el empleo de dos grupos de técnicas: estructurales y funcionales. Ambos tienen ventajas e inconvenientes, pero los más utilizados en la actualidad para fines de control son las funcionales, especialmente los bioensayos con ratón.

En las técnicas funcionales, se someten determinados animales o determinados productos a la acción del material que contiene los tóxicos. Este material produce una reacción en el

sustrato del ensayo, que puede ser la muerte de un ratón, el bloqueo de un canal iónico, o cualquier otra relacionada con su actividad sobre los organismos.

En las estructurales, la concentración de los diversos compuestos tóxicos se determina utilizando sus propiedades físico-químicas. Las funcionales, por tanto, cuantifican la toxicidad (cuantificando el efecto de las toxinas), mientras que las estructurales cuantifican la concentración de toxina o toxinas. De esta diferencia derivan la mayor parte de las ventajas e inconvenientes que tiene cada uno de estos tipos de cuantificación.

Dentro de las técnicas funcionales, es frecuente que, en el caso de trabajar con una mezcla de toxinas, las contribuciones individuales de cada una de ellas son indistinguibles. Esto, no supondría un problema especial sino que más bien sería deseable –ya que daría una estimación exacta de su peligro- si no fuera porque, en general, la sensibilidad de los organismos o reacciones con las que se ensaya, para diferentes toxinas, no es exactamente la misma que la que tiene el hombre. Las técnicas estructurales, por otra parte, podrían ser más útiles que las anteriores dado que cuantifican las concentraciones de cada una de las toxinas en la mezcla. Conociendo el efecto de cada una de las toxinas sobre el hombre resultaría inmediato el cálculo de la toxicidad precisa para el hombre. El problema real es que estos datos raramente se conocen y mucho menos los correspondientes a las presumibles interacciones entre ellos.

La técnica de bioensayo en ratón es utilizada principalmente en la determinación de saxitoxinas, que consiste en extraer las toxinas de los bivalvos utilizando los disolventes adecuados y después, una vez eliminados los disolventes que pudieran interferir con el resultado, inyectarle el extracto intraperitonealmente a ratones (habitualmente machos de 20 g de peso). La acción de las toxinas les produce la muerte en un tiempo que tiene con la concentración una relación hiperbólica, por lo cual en la medida en la que la concentración es menor, la capacidad del bioensayo para estimar adecuadamente la concentración de toxinas se hace mucho menor. La principal ventaja de este bioensayo es que puede detectar toxinas desconocidas, lo cual representa una importante garantía para la salud pública, y que está ya integrado en las regulaciones de muchos países. Los principales inconvenientes son: el gran número de animales a sacrificar para este fin, que en ocasiones sus niveles de detección están próximos a los niveles de toxinas que producen efectos en el hombre, y que para un sistema de control no es conveniente. Ésta técnica está validada internacionalmente (AOAC, 1990). A pesar de su baja sensibilidad, la

experiencia ha demostrado que es una herramienta de rápidos resultados y suficientemente confiable para garantizar la inocuidad de los potenciales transvectores de toxinas marinas.

Otros dos bioensayos con gran potencial son los que utilizan neuroblastoma y bacterias luminiscentes. El primero de ellos, se basa en que determinados compuestos, como la veratridina, producen la apertura del canal del sodio, lo cual lleva a la muerte celular. Las toxinas de tipo PSP (saxitoxina y compuestos relacionados) y la tetrodotoxina, compiten con estos compuestos ligándose al canal del sodio y bloqueándolo, lo cual impide que actúen esos dos compuestos y, por tanto, la muerte celular. La medida en la que una muestra disminuye la mortalidad de las células provocada por los dos compuestos citados, es proporcional a la cantidad de sustancias bloqueantes del canal del sodio que contienen y, por tanto, presumiblemente de saxitoxinas y tetrodotoxinas. Esta técnica presenta el inconveniente fundamental de que resulta dependiente del estado de los cultivos celulares de neuroblastoma, por lo cual ha sido objeto de diversas modificaciones que desembocaron en el desarrollo de un kit en el cual las células están en condiciones muy homogéneas. Se han utilizado también radio-ensayos de ligamiento competitivo a sinaptosomas de rata. En este caso, al tratar los sinaptosomas con saxitoxina marcada radiactivamente, ésta se liga a los canales del sodio que están libres. Si los sinaptosomas son expuestos a una mezcla de saxitoxina tritiada y de la muestra cuya toxicidad se quiere cuantificar, la radiactividad que retengan será proporcional a la cantidad de los compuestos con capacidad para ligarse al canal del sodio que estén presentes en la muestra problema, presumiblemente toxinas en su mayor parte. Aunque esta técnica se desarrolló inicialmente para toxinas PSP, posteriormente se desarrollaron otras modificaciones que emplean brevetoxina y ácido kainico tritiados para cuantificación de NSP y ASP, respectivamente (6,7).

Recientemente se han comenzado a utilizar bioensayos con bacterias a las que se han transferido genes para dotarlas de luminiscencia y que fueron originalmente utilizadas para cuantificar la toxicidad acuática. Estos ensayos son muy sencillos de realizar ya que la luminiscencia desaparece cuando los compuestos que se añaden son tóxicos para dichas bacterias. Aunque, evidentemente, este tipo de ensayo no es específico sí puede utilizarse como comprobación previa al bioensayo de ratón o a otras técnicas más adecuadas.

De entre los métodos estructurales destacan los análisis químicos y los inmunoensayos. La analítica de las toxinas marinas emplea fundamentalmente la separación cromatográfica por HPLC seguida de la detección de las toxinas, en ocasiones requiriendo una reacción química previa (precolumna) o posterior (postcolumna) a la separación cromatográfica, seguida de la detección de las toxinas o de sus derivados habitualmente por medio de espectroscopía UV, espectrofluorimetría o espectrometría de masas.

Existen diversos métodos tanto para la producción de los anticuerpos como para hacer fácilmente detectable la reacción. Se trata de técnicas rápidas, sensibles y cómodas, pero que suelen ser bastante específicas para una toxina, mostrando poca o ninguna reacción con otras del mismo grupo, a veces presentan reacciones cruzadas con otros compuestos, dando falsos positivos y, en muchas ocasiones, aunque detectan adecuadamente, su precisión cuantificando no es buena (11, 13, 15).

2.9 ESPECIFICACIONES TOXICOLÓGICAS

La Secretaría de Salud de México, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), y la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, firmaron un memorándum mediante el cual se da un importante paso para fortalecer las exportaciones mexicanas de moluscos bivalvos (almejas, ostiones y mejillones), provenientes de los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora, luego de permanecer cerrado este mercado desde el año 2001.

En representación del secretario de Salud, doctor Julio Frenk Mora, el titular de la COFEPRIS, licenciado Ernesto Enríquez Rubio, firmó el Memorándum de Entendimiento sobre la Inocuidad y Calidad de los Moluscos Bivalvos de Acuicultura, Frescos y Congelados, Exportados de México a Estados Unidos.

El Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos, coordinado por la dependencia con la participación de las secretarías de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT); de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), y Marina (SEMAR), así como por los Comités Estatales, es la base sobre la cual se sustenta el desarrollo y firma del Memorándum, asegurando la vigilancia sanitaria de conformidad con el marco regulatorio nacional y de Estados Unidos.

En la firma del Memorándum la SAGARPA, a través de CONAPESCA, se asegura el estricto cumplimiento de la Ley de Pesca y sus reglamentos, que sustentan la inspección y vigilancia, así como la ejecución de medidas de control como aseguramientos y la determinación de infracciones administrativas.

Este acuerdo expresa una nueva relación basada en la confianza entre la Secretaría de Salud de México y el Departamento de Salud y Servicios Sociales de Estados Unidos, en apoyo a los productores mexicanos, además de significar un logro al que sólo han accedido algunos países en el mundo (16).

Las especificaciones del total de toxina PSP contenido en un alimento no debe exceder 80µg de STX/100g en carne de molusco según lo establecido por la Secretaría de Salud en la norma 031, este límite fue determinado por medio de un bioensayo en ratones, actualmente este límite está establecido en varios países de América (México, Chile, Estados Unidos de Norteamérica, etc.) y de Europa (Francia, España, etc) (16, 17)

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Entre la segunda semana de Agosto de 2001 y la última de enero de 2002 se realizaron muestreos de moluscos bivalvos provenientes de la playa de la comunidad rural “El Zapotal”, municipio de Pijijiapan, Chiapas.

Por otra parte, durante el mes de Agosto de 2006 hubo una incidencia mas de marea roja, la que tuvo lugar en “La colorada” Santiago Astata, Oaxaca.

Las muestras fueron tomadas por personal de la Secretaría de Marina, del Instituto Nacional de la Pesca y de la Secretaría de Salud, y fueron facilitadas como apoyo para la realización del presente trabajo por el Instituto Nacional de la Pesca, las cuales se tuvieron en congelación (-20°C) desde su recolección hasta el momento de ser utilizadas.

A las muestras recibidas se les efectuó la prueba para determinación de saxitoxina por el método de bioensayo en ratón, de acuerdo con la técnica propuesta por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

3.2 MÉTODO A IMPLEMENTAR

El principio de este método se basa en la aplicación intraperitoneal de 1 mL de extracto acidificado (pH 2 a 4) y clarificado de molusco a un ratón macho de entre 19 y 21g aproximadamente registrando el tiempo de muerte del organismo y determinando las unidades ratón corregidas, a partir de estas y haciendo uso del factor de conversión obtenido de la estandarización del bioensayo, que se realizó utilizando una solución de referencia de saxitoxina, se determinan las concentraciones de PSP en la muestra analizada (18, 19).

Con la finalidad de dar un panorama general del procedimiento que se siguió para implementar el método se presenta la **figura 5** que corresponde al diagrama de flujo de los pasos llevados a cabo:

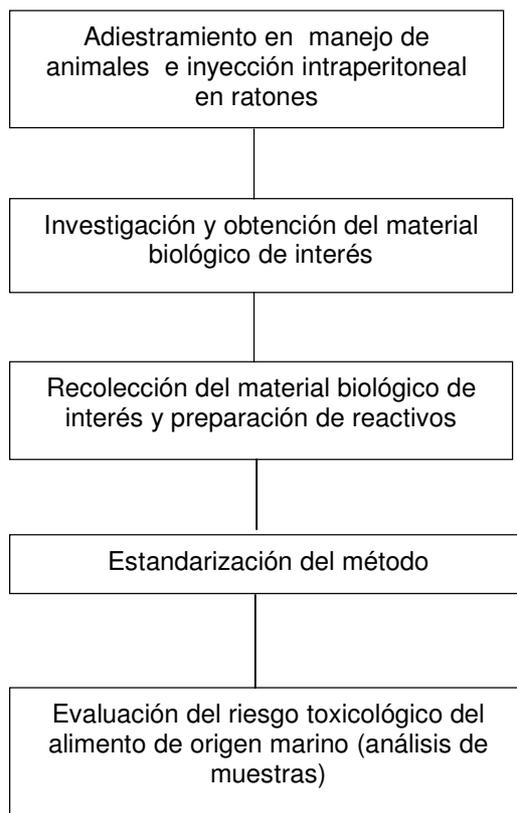


Figura 5. **Diagrama de flujo que muestra la metodología general de trabajo**

El trabajo de laboratorio se realizó en dos partes, correspondientes a la estandarización del método y al análisis de las muestras.

3.3 ESTANDARIZACIÓN DEL BIOENSAYO

La estandarización se realizó para establecer el factor de conversión de unidades ratón a μg de saxitoxina, de acuerdo a los recursos con los que cuenta el laboratorio de la UNEXA de la Facultad de Química.

La ampolleta de saxitoxina utilizada corresponde al lote # 2001/07, marca NRC (National Research Council).

3.3.1 CÁLCULOS PARA LA SOLUCIÓN DE TRABAJO ($1\mu\text{g STX/ mL}$)

De acuerdo con la metodología aprobada por la AOAC (Association of official Analytical Chemists), se hicieron los cálculos para preparar la solución estándar de trabajo ($1\mu\text{g}$ de saxitoxina/mL). A partir de una ampolleta de diclorhidrato de saxitoxina (STXdiHCl) de 0.5 mL con una concentración de $65\mu\text{M}$.

Para preparar la solución de trabajo se hicieron los siguientes cálculos:

$$(65\mu\text{mol STXdiHCl / L}) * (372.2\mu\text{g STXdiHCl / }\mu\text{mol}) = 24193\mu\text{g STXdiHCl / L}$$

Por mililitro de solución tendremos: $24.193\mu\text{g STXdiHCl / mL}$

$$(24.193\mu\text{g STXdiHCl / mL}) * (0.5\text{ mL}) = 12.096\mu\text{g STXdiHCl}$$

En donde

$65\mu\text{mol STXdiHCl / L}$ = Concentración de la toxina en la ampolleta

$372.2\mu\text{g STXdiHCl / }\mu\text{mol}$ = Peso molecular de la toxina como diclorhidrato

0.5 mL = Volumen de toxina en la ampolleta

El resultado de este cálculo corresponde a la cantidad de toxina en la ampolleta, así mismo con este dato es posible determinar la cantidad de agua a agregar (por ampolleta) para llegar a la concentración requerida para la solución de trabajo.

Se utiliza la siguiente ecuación:

Concentración requerida (C) = masa de la toxina (m) / volumen de agua a agregar (V)

Despejando V tenemos: $V = m / C$

Sustituyendo: $V = 12.10 \mu\text{g STX} / (1.0 \mu\text{g STX/mL}) = 12.10 \text{ mL de agua}$

3.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO

Como se mencionó en la introducción, la saxitoxina es estable en condiciones ácidas (pH 2-4), por lo cual para hacer las diluciones se utilizó agua destilada desionizada (resistencia eléctrica $\geq 3 \text{ M}\Omega$) y se ajustó a pH 3 con HCl 5N.

Procedimiento

1. Romper las ampollitas cuidadosamente para evitar la pérdida de toxina (dos ampollitas en nuestro caso), esto es 24.2 μg de STX.
2. Con una micropipeta medir 23.2 mL de agua acidificada a pH 3.
3. Adicionar el contenido de ambas ampollitas en un matraz erlenmeyer de 25 mL.
4. Enjuagar cada ampollita con al agua acidificada (23.2 mL) y vaciarla en el matraz que contiene la toxina.
5. Tapar el matraz con parafilm.
6. Homogenizar manualmente o con un vortex la solución durante 3 minutos aproximadamente.

Nota 1. La ampollita de STXdiCHI se guardó en refrigeración hasta ser utilizada para mantener su estabilidad.

Nota 2. El volumen de agua a agregar no es 12.1 mL, recordar que cada ampollita tiene 0.5 mL.

A continuación se describen con detalle los pasos necesarios para la estandarización del método establecido en el manual oficial de la AOAC:

A partir de una solución de trabajo de $1\mu\text{g} / \text{mL}$, diluir alícuotas de 10 mL de STX con 10,15, 20, 25, 30 mL de agua acidificada respectivamente, homogeneizar e inyectar 1mL de cada dilución a grupos de tres ratones, siguiendo dicha metodología serian necesarios 50 mL de solución de trabajo para ésta parte de la estandarización y 30 mL mas para una posterior dilución, recordemos que se cuenta con 24.2 mL de solución por lo que se tiene una limitante de suma importancia.

Para solucionar el inconveniente mencionado se hicieron los cálculos correspondientes a las concentraciones que se tienen en cada dilución según el procedimiento establecido en los métodos por la AOAC y se adecuó de acuerdo al material con que se cuenta en el laboratorio.

Utilizando la siguiente ecuación se determinó la concentración final de cada dilución:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

En donde:

C_i = Concentración inicial de la solución

V_i = Volumen inicial

C_f = Concentración final de la solución

V_f = Volumen final

Ejemplo

Para 10 mL de solución de trabajo con 10 mL de agua acidifica

$$C_i = 1\mu\text{g} / \text{mL} \quad V_i = 10 \text{ mL}$$

$$C_f = x \quad V_f = 20 \text{ mL (10mL de agua acidificada mas 10mL de solución de trabajo)}$$

Despejando y sustituyendo la ecuación anterior:

$$C_f = (1\mu\text{g STX} / \text{mL}) * 10\text{mL} / 20\text{mL} = 0.5\mu\text{g STX} / \text{mL}$$

Los resultados para todas las diluciones se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Concentraciones de las diluciones siguiendo la metodología de la AOAC

Dilución	10 : 10	10 : 15	10 : 20	10 : 25	10 : 30
V_f (mL)	20	25	30	35	40
C_f ($1\mu\text{g STX}/\text{mL}$)	0.500	0.400	0.333	0.286	0.250

Para optimizar el volumen de toxina con el que se cuenta y realizar la metodología completa se hicieron los cálculos del volumen de agua que se debería agregar para tener la concentración final requerida en cada dilución mostrada en la tabla anterior, utilizando 2 mL de solución de trabajo.

3.3.2.1 CÁLCULOS

Ejemplo

Para la dilución **10:10**

$$C_i = 1\mu\text{g STX /mL} \quad V_i = 2 \text{ mL}$$

$$C_f = 0.5\mu\text{g STX/mL} \quad V_f = x$$

$$V_f = V_i C_i / C_f$$

Sustituyendo

$$V_f = 2 \text{ mL} * (1\mu\text{g STX /mL}) / (0.5\mu\text{g STX/mL}) = 4 \text{ mL}$$

Esto es, si utilizo 2 mL de solución de trabajo debo de agregar 2 mL de agua acidificada para tener una concentración final de 0.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Los valores para cada dilución se dan en la tabla siguiente:

Tabla 3. **Concentración de toxina en las diluciones propuestas por la AOAC.**

Dilución	10 : 10	10 : 15	10 : 20	10 : 25	10 : 30
C_i ($\mu\text{g STX /mL}$)	1	1	1	1	1
C_f ($\mu\text{g STX /mL}$)	0.500	0.400	0.333	0.286	0.250
Vol. de toxina (mL)	2	2	2	2	2
V_f (mL)	4	5	6	7	8
Vol. de H₂O a agregar (mL)	2	3	4	5	6

Tomando en cuenta los valores anteriores se realizó el procedimiento que a continuación se cita:

1. Diluir alícuotas de 2 mL de solución de trabajo con 2, 3, 4, 5 y 6 mL de agua acidificada en tubos de ensaye.
2. Tapar cada tubo con parafilm.
3. Homogeneizar manualmente o en vortex durante 3 minutos aproximadamente.
4. Pesar, marcar y registrar el peso de cada ratón.
5. Inyectar intraperitonealmente 1 mL de cada dilución a grupos de tres ratones de prueba.
6. Registrar el tiempo de inyección y muerte de cada ratón utilizando cronómetro.
7. Determinar la dosis que produce la muerte de un grupo de tres ratones en un tiempo de 5 a 7 minutos.

El tiempo de muerte debe registrarse lo mas aproximado posible a intervalos de 5 segundos, si se registra a 7 segundos redondear a 5 y si se registra 8 segundos redondear a 10 segundos. El tiempo de muerte es el tiempo transcurrido entre el término de la inyección y el último jadeo del ratón utilizando un cronómetro de precisión.

Para determinar de manera mas exacta el factor de conversión la AOAC establece que a partir de la dilución (es) que produce (en) la muerte de los ratones entre 5-7 minutos, es necesario realizar dos diluciones adicionales con un mililitro mas y uno menos, esto es; si la dilución 10:20 produjo la muerte de los ratones en el tiempo indicado, las diluciones a realizarse serian 10 mL de solución de trabajo mas 19 mL de agua y 10 mL de solución de trabajo mas 21 mL de agua, manteniendo las soluciones a pH 3.

Las concentraciones finales para estas diluciones se muestran en la tabla 4

Tabla 4. **Concentraciones de las diluciones utilizando los volúmenes propuestos por la AOAC.**

Dilución	10:19	10:20	10:21
V _f (mL)	29	30	31
C _f (µgSTX/mL)	0.345	0.333	0.323

En el caso del presente trabajo la dilución correspondiente es la 2:4, Para saber la cantidad de agua que se debería agregar manteniendo la relación de concentración se hicieron los cálculos correspondientes y se dan en la tabla 5

Tabla 5. **Volúmenes ajustados a la concentración requerida y al material de trabajo**

C_f ((µgSTX/mL)	0.345	0.333	0.323
V_i (mL)	2	2	2
V_f (mL)	5.8	6.0	6.2
Dilución	2 : 3.8	2 : 4.0	2 : 4.2

Con las diluciones anteriores se inyectan grupos de 10 ratones con un mililitro cada uno, como se observa en la tabla 5 el volumen final es menor a 10 mL que son necesarios para inyectar a todos los ratones, por ello fue necesario prepararlas con el doble de volumen de toxina y de agua.

Ejemplo

Para la dilución 2:3.8 se agregaron 4 mL de solución de trabajo y 7.6 mL de agua acidificada para tener un volumen final de 11.6 mL.

Procedimiento

1. Diluir alícuotas de 4 mL de solución de trabajo con 7.6, 8, y 8.4 mL de agua en tubos de ensaye.
2. Tapar cada tubo con parafilm.
3. Homogeneizar completamente.
4. Verificar que el pH este en 3.
5. Marcar y registrar el peso de cada ratón.
6. Inyectar intraperitonealmente 1 mL de cada dilución a grupos de 10 ratones.
7. Registra el tiempo de muerte de cada ratón en cada grupo.
8. Determinar las dosis que producen la muerte de los ratones entre 5 - 7 minutos.

3.3.3 CALCULOS PARA DETERMINAR EL FACTOR DE CONVERSIÓN

Calcular la mediana de tiempo de muerte para cada grupo de 10 ratones. Descartar los resultados de los grupos de 10 ratones que tienen una mediana de tiempo de muerte < 5 ó > 7 minutos.

Si hay más de un grupo de 10 ratones que tienen una mediana entre 5 y 7 minutos, realizar los cálculos subsecuentes, aunque algunos tiempos de muerte se encuentren fuera del rango deseado ya que lo importante es el valor de la mediana.

Con la mediana del tiempo de muerte y apoyándose en la tabla 1 del anexo A, determinar las unidades ratón por mililitro correspondientes (UR/mL), este cálculo se hace para los dos valores centrales (resultado de ordenar en orden decreciente el tiempo de muerte del grupo de 10 ratones), a estos mismos se les determina el factor de conversión por peso y las unidades ratón corregidas. Con los dos datos obtenidos finalmente se calcula en promedio. Dividir la concentración de la toxina en la dilución seleccionada ($\mu\text{g STX/mL}$) entre las unidades ratón corregidas promedio para obtener el factor de conversión (FC) expresado en $\mu\text{g STX}$ equivalente entre unidad ratón ($\mu\text{g STX eq / UR}$).

Para facilitar el desarrollo de la técnica de estandarización se realizó un diagrama de flujo que se muestra en la **figura 6**.

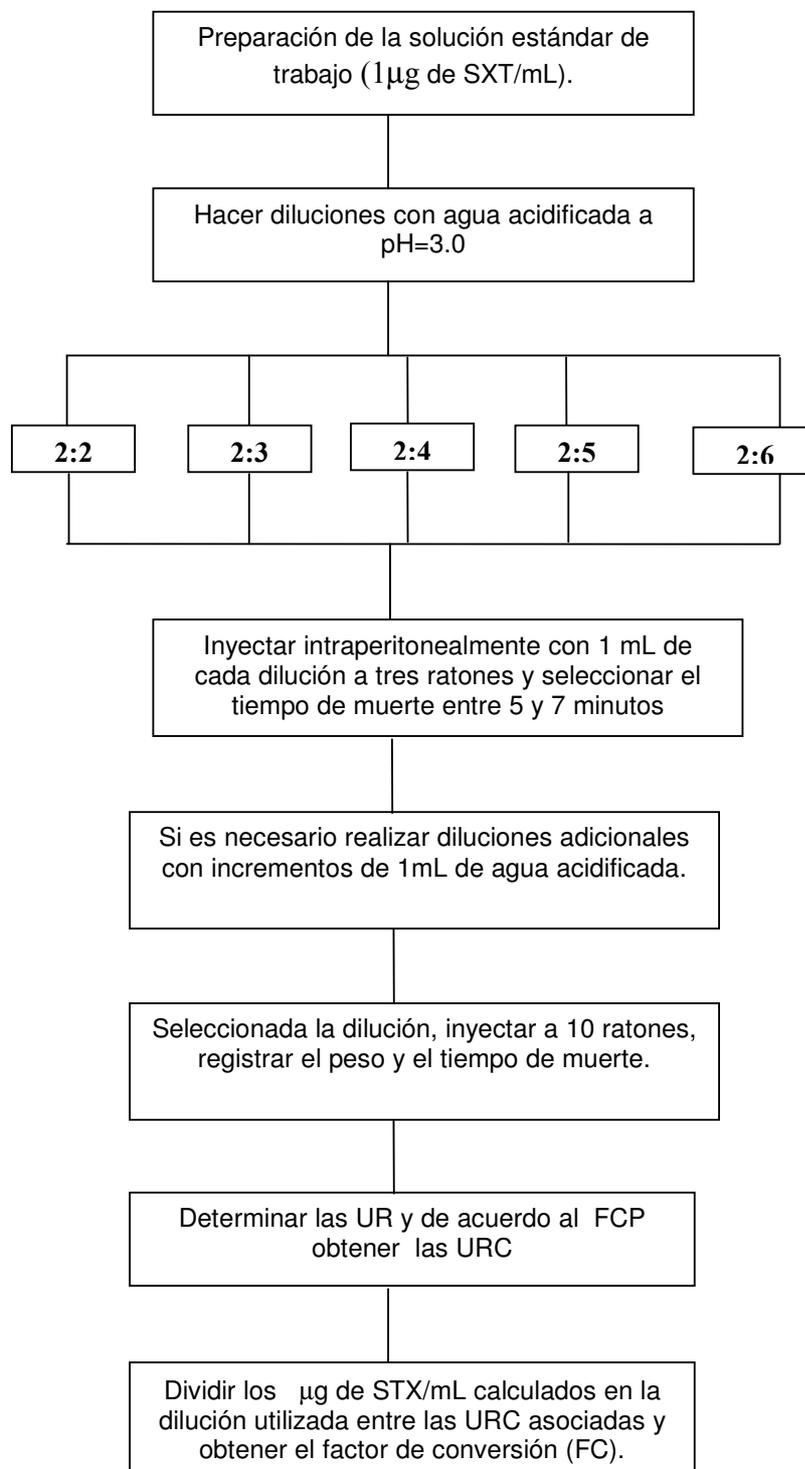


Figura 6. **Diagrama de flujo para la estandarización del bioensayo.**
UR = Unidades ratón; FCP = Factor de corrección de peso; URC = Unidades ratón corregidas; FC = Factor de conversión; FD Factor de dilución.

3.4 ANALISIS DE MUESTRAS

TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra está determinado por las especies de moluscos bivalvos que serán analizadas. En general, un mínimo de 20 piezas de moluscos es suficiente, ya que permite la selección de 10 organismos enteros para el desconchado.

Para la mayoría de las especies, este número rinde aproximadamente 150g de tejido. Cuando se utilizan moluscos bivalvos de talla pequeña, como mejillones, se debe coleccionar una mayor cantidad de piezas para obtener la misma cantidad de tejido desconchado.

3.4.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Almejas, ostiones y mejillones sin procesar
2. Lavar los moluscos bivalvos con agua limpia retirando la arena y cualquier material extraño.
3. Cortar el músculo abductor y abrir.
4. Desconchar la carne con cuidado, sin lesionar el cuerpo del molusco.
5. Colectar aproximadamente 150g de carne sobre un tamiz y dejar escurrir durante 5 minutos.
6. Descartar las conchas.
7. Moler la carne en un homogeneizador o licuadora hasta la homogeneización.

3.4.2 MOLUSCOS BIVALVOS ENLATADOS

1. Abrir la lata y drenar el líquido.
2. Determinar el peso de la carne y el volumen del líquido.
3. Licuar la carne hasta homogeneizar.

En el laboratorio se trabajó con las siguientes muestras:

- ❖ Ostiones ahumados Lote: Y7, Caducidad 31 de Diciembre 2009
- ❖ Mejillones en escabeche Lote:265E-OM25, Caducidad:31 de Diciembre 2009
- ❖ Almejas Lote: 13A Caducidad: Agosto 2007

3.4.3 EXTRACCIÓN DE LA TOXINA

Procedimiento

1. Pesar 100g de carne homogeneizada en un vaso de precipitados de 1000 mL previamente tarado.
2. Añadir 100mL de HCl 0.1 N, homogeneizar completamente en un vaso de precipitados de 500mL y verificar el pH con un potenciómetro, el pH final debe ser 3. Si es necesario se puede ajustar añadiendo unas gotas de HCl 5 N ó NaOH 0.1N.
3. Agitar todo el tiempo para evitar la alcalinización local y la destrucción de la toxina.
4. Calentar el homogeneizado a ebullición suave durante 5 minutos.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente
6. Verificar el pH y ajustar de nuevo si es necesario a 3.
7. Transferir la mezcla a una probeta graduada y diluir a 200 mL con agua destilada y acidificada (pH 3).
8. Colocar la mezcla en un vaso de precipitados; continuar agitando hasta la homogeneización.
9. Dejar reposar hasta que la porción sobrenadante esté translúcida y pueda ser decantada.
10. Centrifugar la mezcla decantada durante 5 minutos a 3000 rpm.
11. Guardar el extracto clarificado en un frasco de muestreo limpio y herméticamente cerrado.

Cabe mencionar que para el caso de moluscos enlatados se sigue el procedimiento anterior, sin embargo para analizar el líquido es necesario medir 100 mL de mismo.

3.4.4 PRUEBA DE BIOENSAYO EN RATÓN

Procedimiento

1. Pesar y marcar cada ratón.
2. Inyectar intraperitonealmente 1 mL de extracto acidificado y clarificado a dos ratones. Si las inyecciones no se hacen directamente en la cavidad peritoneal, el

tiempo de muerte no es reproducible. Descartar cualquier ratón en el que se pierda más de una gota de extracto.

3. Activar el cronómetro en el momento de término de la inyección y observar cuidadosamente el tiempo de muerte, que se manifiesta por el último jadeo del animal.
4. Registrar el tiempo de muerte de cada ratón.
5. Calcular la mediana del tiempo de muerte del grupo.
6. Si el tiempo de muerte o la mediana del tiempo de muerte es < 5 minutos hacer diluciones e inyectar otro lote hasta obtener tiempos de muerte entre 5 a 7 minutos.
7. Si un gran número de diluciones son necesarias, ajustar el pH de la dilución, finalmente inyectar un grupo de tres ratones con la dilución que de una mediana de tiempo de muerte entre 5 a 7 minutos.
8. Determinar las unidades ratón correspondientes.
9. Utilizando el factor de conversión de la estandarización determinar la concentración de toxina en la muestra.

3.4.4.1 CÁLCULOS DE LA CONCENTRACIÓN DE PSP (μg DE STX/ 100g DE TEJIDO)

La toxina se cuantifica en Unidades Ratón, considerando una unidad la cantidad de extracto necesaria para matar un ratón de 20 gramos en 15 minutos, después de la inyección intraperitoneal de 1 mL del extracto de la muestra, para posteriormente hacer la conversión a μg de STX/100g de muestra.

Determinar la mediana a de los tiempos de muerte de cada grupo de ratones, incluyendo los sobrevivientes, utilizando la **tabla 1 del anexo A** determinar los valores correspondientes a las unidades ratón (UR). Si el peso de los animales de prueba es < 19g o > 21g hacer la corrección para cada ratón con ayuda de la **tabla 2 del mismo anexo** para obtener el factor de corrección por peso (FCP). Multiplicar las unidades ratón por el factor de corrección de peso (FCP) para determinar la mediana de las unidades ratón corregidas (URC) de ese grupo de ratones (considerar el tiempo de muerte de los sobrevivientes como > 60minutos o el equivalente a < 0.785 UR en los cálculos de la mediana).

Convertir las unidades ratón a μg de STX / mL, para ello es necesario multiplicar las UR/mL por el factor de conversión (FC) obtenido en la estandarización, posteriormente desarrollar la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g STX equivalente}/100\text{g de tejido de molusco} = \mu\text{g de STX /mL} * \text{factor de dilución} * 200$$

En donde 200 es el volumen de aforo del extracto preparado y equivale a 100g de tejido del molusco.

Cualquier valor mayor de $80\mu\text{g} /100\text{g}$ es considerado como peligroso y no apto para consumo humano (debe prohibirse el consumo de este producto).

3.4.4.2 EJEMPLO DE CÁLCULO

Primero se calcula la diferencia entre la hora final (tiempo en que se presenta el último jadeo del ratón) menos la hora inicial (el momento en que se terminó de inyectar) para tener el tiempo de muerte, esto es:

Si un ratón muere cuando el cronómetro marca 0.46'40" (0 horas, 46 minutos y 40 segundos) y se terminó de inyectar cuando marcaba 0.40'35", entonces su tiempo de muerte es 0.06'05", este tiempo de muerte se busca en la **tabla 1 (anexo A)** y se obtienen las unidades ratón (UR) correspondientes, para este ejemplo son 1.6 UR (marcadas en negritas en la tabla del anexo A), para sacar el factor de corrección por peso (FCP), se busca en la **tabla 2 del mismo anexo**, el dato correspondiente al peso del ratón, obteniéndose de esta manera lo siguiente: si el peso del ratón es de 20.7g su FCP es 1.015.

Para obtener las unidades ratón corregidas, se multiplican las UR por el FCP, esto da como resultado 1.62 (URC/mL), este valor a su vez se multiplica por el factor de conversión que se obtiene de la estandarización, suponiendo que dicho factor es $1 \text{ UR} = 0.19 \mu\text{g}$ de STX se tiene lo siguiente:

$$(1.62 \text{ URC/mL}) * (0.19\mu\text{g STX}/1 \text{ URC}) = 0.307\mu\text{g STX/mL}$$

$$\mu\text{g toxina}/100\text{g de tejido de molusco} = 0.307 \mu\text{g STX/mL} * \text{factor de dilución} * 200$$

Nota 3: Las unidades ratón corregidas se expresan como URC/mL debido a que el volumen que se inyecta al ratón tiene como unidades mililitro.

El factor de dilución se determina de la siguiente manera:

Si fue necesario hacer varias diluciones y la que produjo la muerte de los ratones entre 5 y 7 minutos es aquella en la que se tomó un mililitro del extracto clarificado y se llevó a 40 mL entonces el factor de dilución es 40, por lo tanto al sustituir los datos se tiene lo siguiente:

$$\begin{aligned}\mu\text{g toxina}/100\text{g de tejido de molusco} &= 0.307 \mu\text{g STX}/\text{mL} * 40 * 200 \\ &= 2456 \mu\text{g STX eq}/100\text{g de tejido de molusco}.\end{aligned}$$

Parar facilitar el desarrollo en el laboratorio de la técnica de extracción de la toxina, se desarrolló un diagrama de flujo que se muestra en la **figura 7**.

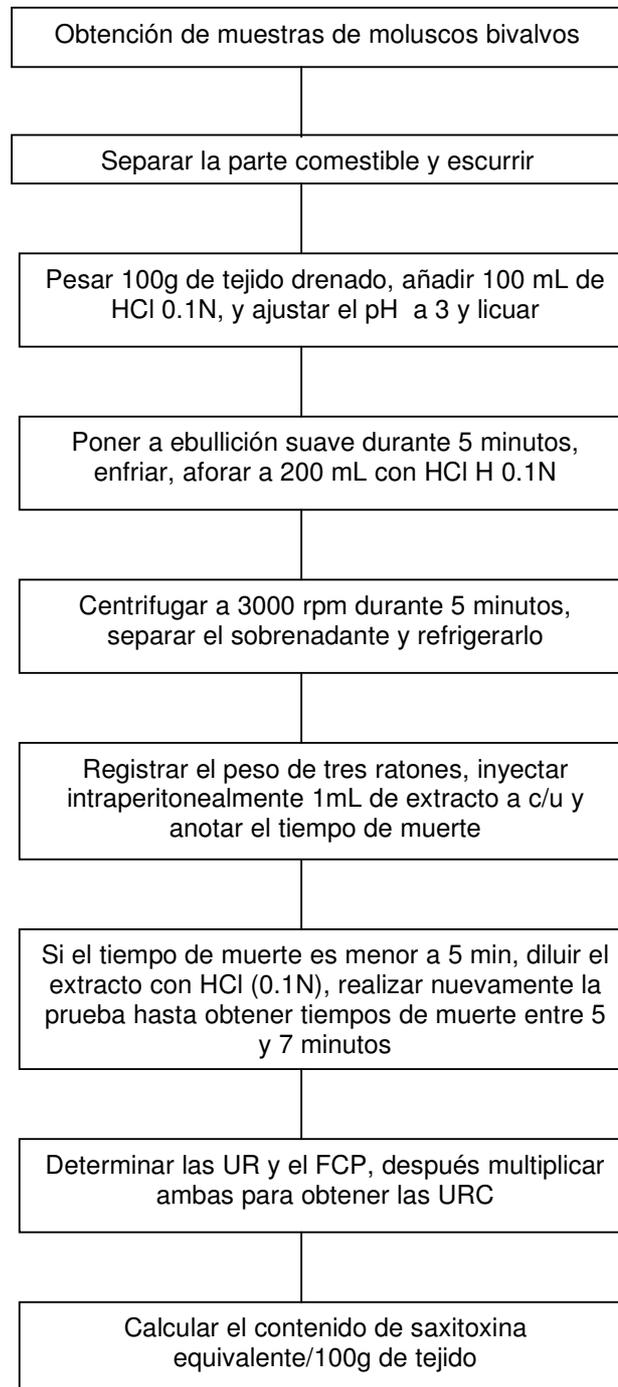


Figura 8. Diagrama de flujo de la técnica de la extracción de toxina PSP de mariscos. μg = Microgramos; UR = Unidades ratón; FCP = Factor de corrección de peso; URC = Unidades ratón corregidas; FC = Factor de conversión; FD Factor de dilución.

4.1 Estandarización

De las últimas tres diluciones realizadas para determinar aquella que produce la muerte de los ratones en un tiempo entre 5 y 7 minutos, dos de ellas tuvieron una mediana de tiempo de muerte requeridos, esos resultados se dan en las **tablas 6 y 7**.

Tabla. 6. Resultados de la estandarización del bioensayo

ESTANDARIZACIÓN									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX
1	17	4:8.4	12:46:04	12:51:06	00:05:02 (6)	1.92	0.880	1.690	0.191
2	17	4:8.4	12:47:16	12:52:08	00:04:52 (4)	--	--	--	--
3	17.4	4:8.4	12:48:40	12:53:28	00:04:48 (2)	--	--	--	--
4	17.5	4:8.4	12:54:20	12:59:28	00:05:08 (5)	1.86	0.905	1.683	0.192
5	17.5	4:8.4	12:55:49	13:02:03	00:06:14 (10)	--	--	--	--
6	17.2	4:8.4	12:58:08	13:02:56	00:04:48 (3)	--	--	--	--
7	17.4	4:8.4	01:04:00	01:09:53	00:05:53 (9)	--	--	--	--
8	17.4	4:8.4	01:05:13	01:10:53	00:05:40 (8)	--	--	--	--
9	17.2	4:8.4	01:07:00	01:11:15	00:04:15 (1)	--	--	--	--
10	17	4:8.4	01:08:34	01:14:05	00:05:31 (7)	--	--	--	--
La mediana del tiempo de muerte se encuentra en los ordenes de muerte 5 y 6, con los cuales se calculó la concentración de saxitoxina y se obtuvo el promedio para obtener la concentración correspondiente a la dilución 4:8.4									0.192

RATÓN = número de ratón.

H. INICIAL = hora inicial = hora en la que se terminó de inyectar al ratón.

H. FINAL = hora final = hora de muerte del ratón (último jadeo).

T. DE M. (ORDEN) = tiempo de muerte del ratón (orden en que murió el ratón).

µg STX = Microgramos de saxitoxina; UR = Unidades ratón; FCP = Factor de corrección de peso; URC = Unidades ratón corregidas.

Tabla. 7. Resultados de la estandarización del bioensayo

ESTANDARIZACIÓN									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX
1	19.1	4:7.6	11:36:03	11:42:09	00:06:06 (8)	1.6	0.97	1.552	0.222
2	19	4:7.6	11:37:36	11:43:00	00:05:24 (5)	1.8	0.97	1.746	0.198
3	18.9	4:7.6	11:39:20	11:44:38	00:05:18 (2)	1.8	0.905	1.629	0.212
4	18.5	4:7.6	11:46:03	11:51:26	00:05:23 (4)	1.8	0.905	1.629	0.212
5	19	4:7.6	11:47:43	11:53:05	00:05:22 (3)	1.8	0.97	1.746	0.198
6	19.1	4:7.6	11:49:19	12:49:19	01:00:00 (10)	0.875	0.97	0.849	0.406
7	19	4:7.6	11:54:24	12:00:07	00:05:43 (6)	1.67	0.97	1.620	0.213
8	19.9	4:7.6	11:56:00	12:01:14	00:05:14 (1)	1.83	1	1.830	0.189
9	19.2	4:7.6	11:57:38	12:03:38	00:06:00 (7)	1.6	0.97	1.552	0.222
10	18.8	4:7.6	11:58:59	12:58:59	01:00:00 (9)	0.875	0.905	0.792	0.436
La mediana del tiempo de muerte se encuentra en los ordenes de muerte 5 y 6, con los cuales se calculó la concentración de saxitoxina y se obtuvo el promedio para obtener la concentración correspondiente a la dilución 4:7.6									0.205

RATÓN = número de ratón.

H. INICIAL = hora inicial = hora en la que se terminó de inyectar al ratón.

H. FINAL = hora final = hora de muerte del ratón (último jadeo).

T. DE M. (ORDEN) = tiempo de muerte del ratón (orden en que murió el ratón).

UR = Unidades ratón; FCP = Factor de corrección de peso; URC = Unidades ratón corregidas; µg STX = Microgramos de saxitoxina

Para determinar la dilución que produce tiempos de muerte que se encuentren entre 5 y 7 minutos, se inyectaron grupos de tres ratones con 1ml de las diluciones correspondientes a 10:10, 10:15, 10:20, 10:25 y 10:30, de las cuales la dilución que cumple con el tiempo de muerte recomendado fue la dilución 10:20 que corresponde a la concentración de 0.333 μ g de STX.

Como lo establece la metodología propuesta por la AOAC, de esta dilución se hicieron dos mas una de 10:19 y una mas de 10:21 (Ver metodología), que corresponden a las concentraciones 0.345 μ g de STX y 0.323 μ de STX respectivamente.

Con las tres últimas diluciones mencionadas se inyectaron grupos de 10 ratones con 1ml de cada dilución y se determinó la mediana del tiempo de muerte de cada grupo, dos de ellas tuvieron el tiempo de muerte recomendado, con estas se determinó el factor de conversión para cada dilución los cuales fueron 1UR = 0.192 μ g de STX y 1UR = 0.205 μ g de STX (**ver tablas 6 y 7**), posteriormente con estos datos se calculó el promedio obteniéndose el siguiente factor de conversión 1 UR = 0.199 μ g STX equivalente.

Este dato se utilizará posteriormente para determinar la concentración de toxina en las muestras.

El factor de conversión obtenido experimentalmente se encuentra dentro del rango establecido en la literatura (0.18 - 0.20 μ g STX = 1UR), por lo tanto siguiendo buenas prácticas de laboratorio se demuestra que es posible establecer la metodología de bioensayo en ratón en el laboratorio de la UNEXA utilizando una cepa diferente (ICR) a la recomendada en la metodología propuesta por la AOAC (Webster).

4.2 Producto enlatado

Una vez contando con el factor de conversión obtenido en la estandarización, se tuvo la posibilidad de analizar muestras sospechosas de la presencia de biotoxinas marinas responsables de provocar PSP, expresados en términos de equivalentes de saxitoxina.

A continuación, en la **tabla 8**, se muestran los resultados de las muestras analizadas.

Tabla 8. Resultados del análisis de moluscos enlatados

MEJILLÓN (MASA DRENADA)									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M.	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g muestra
1	19.8	S/D	12:06:00		>60 min	0.875	1	0.875	34.825
2	19.3	S/D	12:08:27		>60 min				
3	18.7	S/D	12:11:19		>60 min				
MEJILLÓN (LÍQUIDO)									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M.	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g muestra
1	18.9	S/D	12:17:15		>60 min	0.875	0.970	0.849	33.780
2	18.5	S/D	12:19:30		>60 min				
3	18.8	S/D	12:23:59		>60 min				
ALMEJA (MASA DRENADA)									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M.	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g muestra
1	18.2	S/D	12:42:02		>60 min	0.875	0.93	0.814	32.387
2	19.8	S/D	12:43:44		>60 min				
3	18.5	S/D	12:46:56		>60 min				
ALMEJA (LÍQUIDO)									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M.	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g muestra
1	19.5	S/D	12:27:23		> 60 min	0.875	0.985	0.862	34.303
2	18.6	S/D	12:29:30		> 60 min				
3	18.9	S/D	12:31:08		> 60 min				
OSTIÓN (MASA DRENADA)									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M.	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g muestra
1	19.4	S/D	12:35:16		> 60 min	0.875	0.985	0.862	34.303
2	18.4	S/D	12:37:22		> 60 min				
3	19.2	S/D	12:39:05		> 60 min				
OSTIÓN (LÍQUIDO)									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M.	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g muestra
1	19.7	S/D	12:49:46		> 60 min	0.875	0.985	0.862	34.303
2	19	S/D	12:51:28		> 60 min				
3	18.2	S/D	12:56:51		> 60 min				

RATÓN = número de ratón; S/D = Sin dilución; H. INICIAL = hora inicial = hora en la que se terminó de inyectar al ratón (horas, minutos y segundos); H. FINAL = hora final = hora de muerte del ratón (horas, minutos y segundos); T. DE M. = tiempo de muerte del ratón; UR = Unidades ratón; FCP = Factor de corrección de peso; URC = Unidades ratón corregidas; µg STX Eq = Microgramos de saxitoxina equivalente

Cabe señalar que para el análisis de moluscos enlatados (almejas ostiones y mejillones), en caso de salir positiva la determinación de toxina, es necesario hacer un análisis tanto del líquido como de la masa drenada y para los cálculos se debe sumar la concentración determinada en la masa drenada más la determinada en el líquido.

En este trabajo el análisis de moluscos enlatados se realizó con la finalidad de familiarizarse completamente con la metodología y detectar aquellos puntos en los cuales se requiere tener mayor control y evitar fallas en el resultado final de la cuantificación.

Se hizo el análisis de las siguientes muestras: mejillones, almejas y ostiones, asumiéndose como libres de toxina por estar a la venta para el consumidor final, pues como se sabe un producto destinado para consumo humano debe pasar diferentes controles de sanidad antes de su distribución.

El tiempo de muerte se tomó como >60 minutos (**ver tabla 8**), los ratones se tuvieron en observación por 24 horas, durante este tiempo ninguno de ellos presentó sintomatología correspondiente a PSP.

Como se observa en la **tabla 8** el tiempo de muerte de cada ratón es mayor a 60 minutos, todos los ratones estuvieron en observación durante 24 horas dentro de las cuales no se presentaron signos característicos del envenenamiento paralizante, cuando esto ocurre las muestras se consideran libres de la toxina y no es necesario determinar las unidades ratón, el factor de corrección por peso y otros factores. Sin embargo en la misma tabla se reporta para cada muestra una cantidad de toxina ($\mu\text{g STX Eq /100g}$ muestra), aclarando que este cálculo se hizo para conocer el procedimiento completo en caso de tener muestras positivas.

Por lo tanto las muestras analizadas en esta parte del trabajo se consideran aptas para consumo humano.

4.3 Análisis de muestras sospechosas

En la **tabla 9**, mostrada a continuación, se dan los resultados correspondientes a la marea roja que tuvo lugar en Chiapas a finales del año 2001 y principios del 2002.

Tabla 9. Resultados de análisis de muestras provenientes de “El Zapotal”, Chiapas

ALMEJA 10/OCTUBRE/2001									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	19	1/42	01:25:10	1:30:33	00:05:23 (2)	1.8	0.97	1.746	2918.614
2	19.5	1/42	01:26:03	1:31:00	00:04:57 (1)	1.96			
3	18.8	1/42	01:28:31	1:34:04	00:05:33 (3)	1.74			
ALMEJA 05/NOVIEMBRE/2001									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	20.7	1/40	00:40:35	00:46:40	00:06:05 (3)				
2	19.4	1/40	00:49:38	00:54:43	00:05:05 (1)				
3	20.7	1/40	00:55:55	01:01:30	00:05:35 (2)	1.69	1.015	1.715	2730.837
ALMEJA 03/DICIEMBRE/2001									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	20.3	1/45	00:13:08	00:20:05	00:06:57 (2)	1.39	1.015	1.411	2526.832
2	18.3	1/45	00:21:59	00:29:35	00:07:36 (3)				
3	19.1	1/45	00:23:32	00:29:29	00:05:57 (1)				
ALMEJA 27/DICIEMBRE/2001									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	20.1	1/53	00:00:00	00:05:17	00:05:17 (3)				
2	20.1	1/53	00:01:50	00:06:54	00:05:04 (2)	1.8	1	1.8	3796.920
3	20	1/53	00:03:21	00:07:50	00:04:29 (1)				
ALMEJA 08/ENERO/2002									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	19.2	1/22	00:13:41	00:19:16	00:05:35 (1)				
2	20.3	1/22	00:33:07	00:38:52	00:05:45 (2)	1.67	1.015	1.695	1484.186
3	20.1	1/22	00:41:24	00:48:13	00:06:49 (3)				
ALMEJA 30/ENERO/2002									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	18	1/20	00:47:34	00:54:11	00:06:37 (3)				
2	17.7	1/20	00:56:13	01:00:41	00:04:28 (1)				
3	19	1/20	00:57:54	01:02:57	00:05:03 (2)	1.89	0.97	1.833	1459.307

RATÓN = número de ratón; H. INICIAL = hora inicial = hora en la que se terminó de inyectar al ratón (horas, minutos y segundos); H. FINAL = hora final = hora de muerte del ratón (horas, minutos y segundos); T. DE M. = tiempo de muerte del ratón [horas, minutos y segundos] (orden en que murió el ratón); UR = Unidades ratón; FCP = Factor de corrección de peso; URC = Unidades ratón corregidas; µg STX Eq = Microgramos de saxitoxina equivalente.

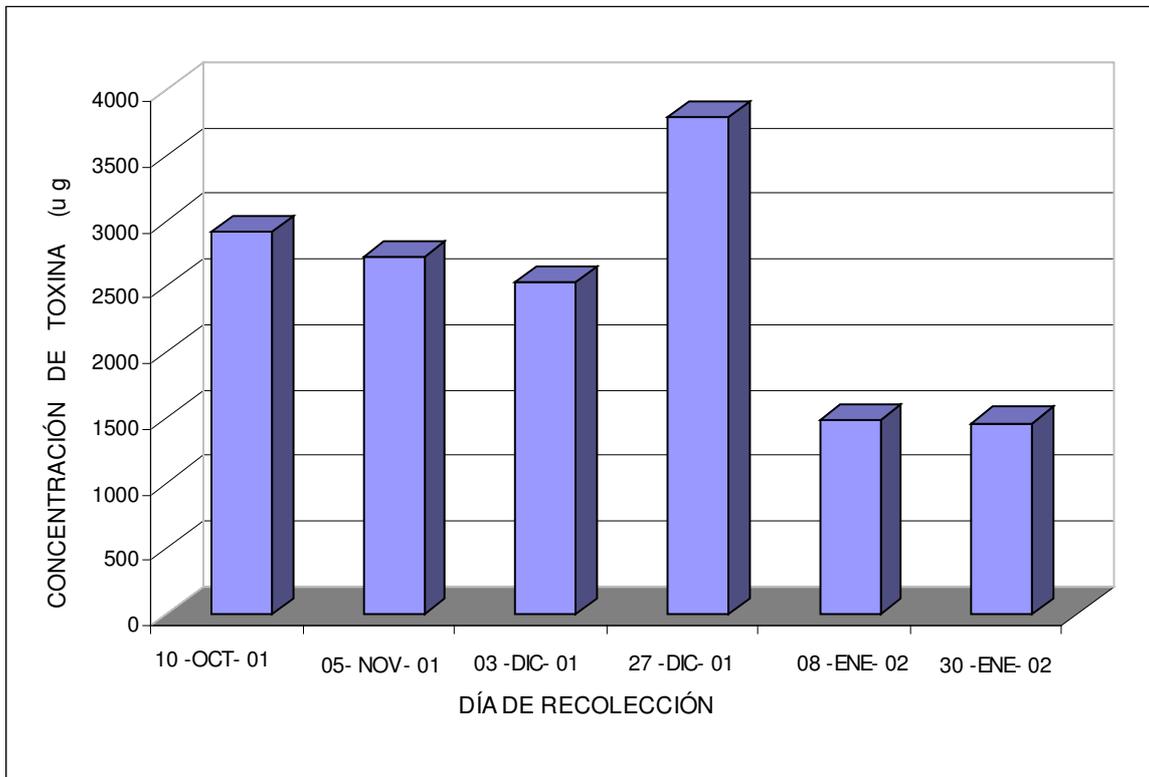


Figura 9. Gráfica de la concentración de toxina en cada muestreo.

Como se observa en la **tabla 9** las muestras de almejas recolectadas del 10 de octubre del 2001 hasta el 30 de enero del 2002, mostraron concentraciones de toxina sumamente elevadas llegando hasta $3796.920\mu\text{g} / 100\text{g}$ de muestra (19080 UR) para el día 27 de diciembre de 2001.

La menor concentración de toxina en las muestras fue $1459.307\mu\text{g}/100\text{g}$ de muestra que corresponde al día 30 de enero de 2002, no obstante que la concentración de toxina es considerablemente menor comparada con la mas alta, sigue siendo elevada, sumamente peligrosa para la salud humana y letal de llegarse a consumir dichos productos.

La **figura 9** muestra que después del máximo valor obtenido el día 27 de diciembre de 2001, la concentración de saxitoxina empieza a descender hasta el día 30 de enero del año siguiente, sin embargo con las muestras analizadas no es posible decir a partir de que día es seguro empezar a consumir los productos provenientes de la zona afectada, ya que el límite máximo permitido por la secretaría de salud para esta tipo de toxina es de $80\mu\text{g}/100\text{g}$ de tejido (NOM-031-SSA1-1993).

Todas las muestras analizadas presentaron una elevada cantidad de toxina, superando en límite permitido en mas de 16 veces, por lo que estos productos marinos son de alto riesgo a la salud del consumidor.

Con esta información nos es posible afirmar que la marea roja ocurrida en Chiapas tuvo un alto nivel de dinoflagelados tóxicos, por otra parte esta afirmación se respalda con la información proporcionada por el Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) del Instituto Nacional de la Pesca, quienes además identificaron al microorganismo responsable del fenómeno mencionado, dicho microorganismo fue ***Gymnodinium bahamense***.

De acuerdo a la información proporcionada por el Instituto Nacional de la Pesca, esta marea roja produjo la intoxicación de 19 personas e incluso la muerte de dos niños.

En cuanto a la muestras provenientes de Oaxaca, se analizó otro tipo de molusco (callo margarita), el cual no es tan conocido como las almejas, los ostiones o los mejillones, sin embargo también almacena la saxitoxina y puede poner en peligro la salud humana en caso de estar contaminado, los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 10. **Resultados de las muestras provenientes de “La Colorada”, Oaxaca**

VÍ CERAS DE CALLO MARGARITA 01/AGOSTO/2006									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	19.6	1/2	00:34:42	00:39:43	00:05:01 (1)				
2	20.3	1/2	00:17:48	00:23:26	00:05:38 (3)				
3	20.1	1/2	00:52:23	00:57:30	00:05:07 (2)	1.890	1.000	1.890	150.444
MEJILLÓN 01/AGOSTO/2006									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	18.3	S/D	01:15:23		>60 min (2)	0.085	0.905	0.791	<31.482
2	18.5	S/D	01:17:17		>60 min (3)				
3	18.7	S/D	01:18:02		>60 min (1)				
VÍ CERAS DE CALLO MARGARITA 29/AGOSTO/2006									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	17.7	1/1.5	01:20:25	01:26:21	00:05:56 (2)	1.6	0.905	1.45	86.565
2	17.2	1/1.5	01:24:16	01:29:48	00:05:32 (1)				
3	16.2	1/1.5	01:29:02	01:35:35	00:06:33 (3)				
MEJILLÓN 29/AGOSTO/2006									
# RATÓN	PESO (g)	DILUCIÓN	H.INICIAL	H.FINAL	T. DE M. (ORDEN)	UR	FCP	URC	µg STX Eq/100g MUESTRA
1	17.4	S/D	01:37:33		>60 min (2)	0.875	0.905	0.791	<31.482
2	17.2	S/D	01:42:03		>60 min (3)				
3	17.2	S/D	01:46:02		>60 min (1)				

RATÓN = número de ratón; S/D = Sin dilución; H. INICIAL = hora inicial = hora en la que se terminó de inyectar al ratón (horas, minutos y segundos); H. FINAL = hora final = hora de muerte del ratón (horas, minutos y segundos); T. DE M. (ORDEN) = tiempo de muerte del ratón [horas, minutos y segundos] (orden de muerte del ratón); UR = Unidades ratón; FCP = Factor de corrección de peso; URC = Unidades ratón corregidas; µg STX Eq = Microgramos de saxitoxina equivalente.

En la **tabla 10** se puede comparar un alto nivel de toxina en la muestra correspondiente a callo margarita recolectada el día 01 de Agosto del 2006 con una concentración de 150.44 $\mu\text{g STXeq}/100\text{g}$ de molusco. Para el día 29 de Agosto de 2006 la concentración de toxina en la misma muestra disminuyó, sin embargo aun estaba por arriba del límite establecido en la NOM.331-SSA1-1993 ($80\mu\text{g STX}/100\text{g}$ de muestra).

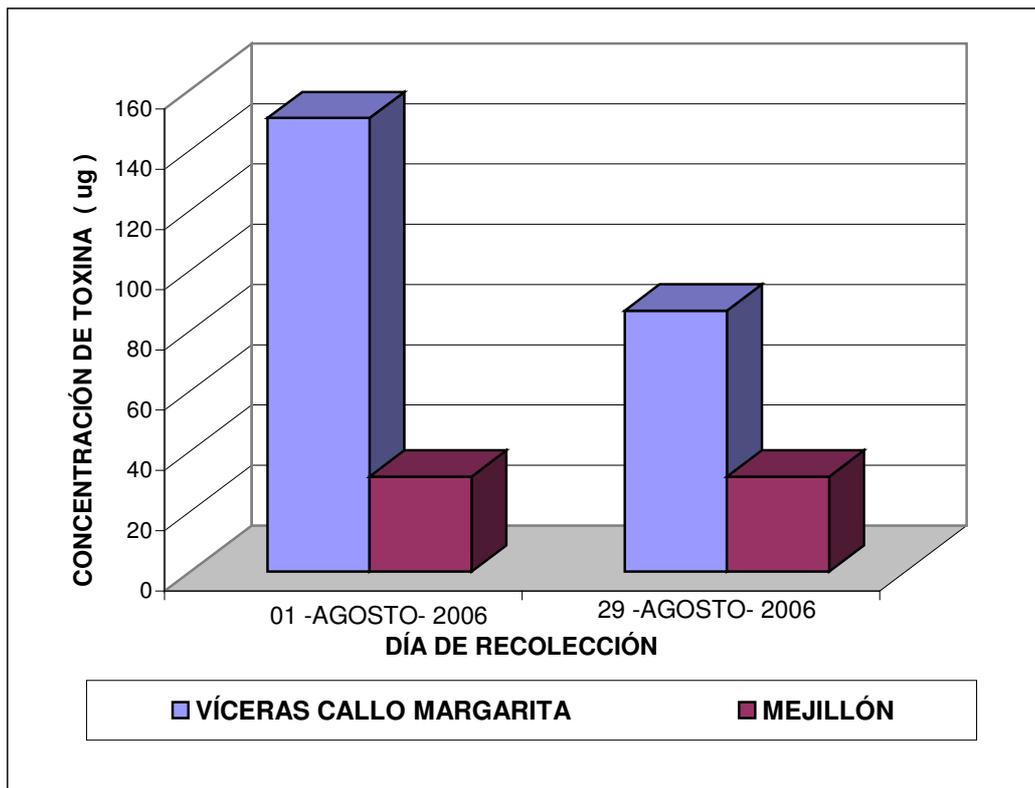


Figura10. Nivel de toxina en muestras provenientes La colorada, Oaxaca

No obstante que las muestra de callo margarita y mejillón se recolectaron el mismo día y en la misma zona (**ver tabla 11**), la concentración de toxina contrasta en gran medida, esto muestra en la **tabla 10**.

Este contraste se atribuye a varios factores, entre ellos, la capacidad de filtración que posee cada especie de molusco, su capacidad de eliminación de la toxina y al diferente grado de afinidad de los canales de sodio, en cada molusco, por las saxitoxinas.

Tabla 11. Datos complementarios de los extractos

PRODUCTO	FECHA DE RECOLECCIÓN	HORA DE CAPTURA	POSICIÓN
Vísceras de callo Margarita	01/Agosto/2006	12:12	15° 56' 23.4 " LN 095° 35' 18.7" LW
Mejillón	01/Agosto/2006	10:30	15° 56' 15.7 " LN 095° 36' 30.8" LW
Vísceras de callo Margarita	29/Agosto/2006	13:11	15° 56' 24.5 " LN 095° 34' 53.3" LW
Mejillón	29/Agosto/2006	11:28	15° 56' 21.6 " LN 095° 36' 23.8" LW

La posición se reporta en grados, minutos y segundos; LN = Latitud norte; LW = Longitud oeste.

En lo referente a la muestra de mejillón, este tuvo niveles muy bajos de toxina para ambas fechas de recolección (**ver figura 10**).

En la tabla 12 se comparan los datos obtenidos en el laboratorio de la UNEXA con los determinados en Salina Cruz por el Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP). En la cual podemos ver que los datos obtenidos por ambas Instituciones son similares, a excepción de la muestra víscera callo margarita correspondiente al día 01 de agosto, en la cual hay una diferencia de 50µg de STX equivalente aproximadamente.

Por lo anterior es recomendable ponerse en contacto con el CRIP con la finalidad de adquirir otra muestra correspondiente a víscera callo margarita y analizarla nuevamente teniendo un buen control en cada uno de los pasos, de esta manera comparar nuevamente los resultados y concluir en que parte del procedimiento pudo haber una desviación que causara esta diferencia.

Tabla 12. Comparación de datos obtenidos en ambas instituciones.

Muestra	CRIP (μg STX eq/100g molusco)	UNEXA (μg STX eq/ 100g molusco)
Vísceras callo margarita (01/Agosto/06)	100.72	150.444
Mejillón (01/Agosto/06)	<32.25	<31.482
Vísceras callo margarita (29/Agosto/06)	88.08	86.565
Mejillón (29/Agosto/06)	<31.59	<31.482

μg STX eq = microgramos de saxitoxina equivalente; CRIP = Centro Regional de Investigación Pesquera; UNEXA = Unidad de Experimentación Animal.

Para las muestras en las que la concentración se reporta con el símbolo <, los ratones utilizados no murieron; sin embargo, si presentaron signos correspondientes a envenenamiento paralizante dentro de las 24 horas que se tuvieron en observación, presentándose principalmente incoordinación de extremidades y dificultad respiratoria. Estos signos no duraron por más de 20 minutos, esto indica que la concentración de toxina no era suficiente para producir la muerte de los ratones además de encontrarse dentro del rango establecido en la NOM-031-SSA1-1993.

- ❖ Llevando a cabo buenas prácticas de laboratorio es posible implementar, en el laboratorio de la UNEXA, la determinación de saxitoxinas por el método de bioensayo en ratón utilizando una cepa de ratón diferente a la recomendada en la metodología propuesta por la AOAC.

- ❖ Debido al peligro de las saxitoxinas y a la frecuencia con que se presentan intoxicaciones debidas a esta toxina, en México, se hace necesario establecer laboratorios certificados en su determinación a fin de ser capaces de atender el volumen de captura tanto de consumo doméstico como de exportación para productos con riesgo potencial de producir PSP.

RECOMENDACIÓN

- ❖ El fenómeno "marea roja" debe ser informado y conocido por la población, reportado y monitoreado por las autoridades competentes antes de permitir el consumo humano de los organismos vectores de PSP a fin de evitar brotes por envenenamiento paralizante.

CAPÍTULO 6

ANEXO A

Tabla1. Tiempo de muerte y unidades ratón relacionadas con la PSP

Tiempo de muerte*	Unidades Ratón	Tiempo de muerte*	Unidades Ratón
01:00	100	05:00	1.92
01:10	66.2	05:05	1.89
01:15	38.3	05:10	1.86
01:20	26.4	05:15	1.83
01:25	20.7	05:20	1.8
01:30	16.5	05:30	1.74
01:35	13.9	05:40	1.69
01:40	11.9	05:45	1.67
01:45	10.4	05:50	1.64
01:50	9.33	06:00	1.6
01:55	8.42	06:15	1.54
02:00	7.67	06:30	1.49
02:05	7.04	06:45	1.43
02:10	6.52	07:00	1.39
02:15	6.06	07:15	1.35
02:20	5.66	07:30	1.31
02:25	5.32	07:45	1.28
02:30	5	08:00	1.25
02:35	4.73	08:15	1.22
02:40	4.48	08:30	1.2
02:45	4.26	08:45	1.18
02:50	4.06	09:00	1.16
02:55	3.88	09:30	1.13

*En minutos: segundos

Continuación de la tabla 1.

Tiempo de muerte*	Unidades Ratón	Tiempo de muerte*	Unidades Ratón
03:00	3.7	10:00	1.11
03:05	3.57	30	1.09
03:10	3.43	11:00	1.075
03:15	3.31	30	1.06
03:20	3.19	12:00	1.05
03:25	3.08	13:00	1.03
03:30	2.98	14:00	1.015
03:35	2.88	15:00	1
03:40	2.79	16:00	0.99
03:45	2.71	17:00	0.98
03:50	2.63	18:00	0.972
03:55	2.56	19:00	0.965
04:00	2.5	20:00	0.96
04:05	2.44	21:00	0.954
04:10	2.38	22:00	0.948
04:15	2.32	23:00	0.942
04:20	2.26	24:00	0.937
04:25	2.21	25:00	0.934
04:30	2.16	30:00	0.917
04:35	2.12	40:00	0.898
04:40	2.08	60:00	0.875
04:45	2.04		
04:50	2		
04:55	1.96		

*En minutos: segundos.

Tabla 2. Factor de conversión para el peso del ratón

Peso del ratón (g)	Unidades ratón
10	0.5
10.5	0.53
11	0.56
11.5	0.59
12	0.62
12.5	0.65
13	0.675
13.5	0.7
14	0.73
14.5	0.76
15	0.785
15.5	0.81
16	0.84
16.5	0.86
17	0.88
17.5	0.905
18	0.93
18.5	0.95
19	0.97
19.5	0.985
20	1
20.5	1.015
21	1.03
21.5	1.04
22	1.05
22.5	1.06
23	1.07

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

1. Cortés Altamirano, Roberto. *Las Mareas Rojas*. AGT Editor. México D.F, 1998, pp. 1-3, 43-44, 51-52, 63-66, 81-82, 89-91, 98-106.
2. Instituto de Ciencias del Mar. Página consultada el 18 de febrero de 2007. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1993-1/articulo427.html>
3. Chávez Villasana, Adolfo. Ledesma S. J. Angel. *Tablas de recomendaciones y valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica*. INN. México D.F, 1997. pp. 30-36.
4. Feldman, M.D. *Principios de Nutrición Clínica*. Editorial, El Manual Moderno. México D.F, 1990. pp. 102-103
5. INEGI, Fecha de actualización Miércoles, 23 de noviembre de 2005, consultada el día 20 de Febrero de 2007. <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mamb149&c=6596>
6. Ralonde, Raymond. *Alaska's Marine Resources*. Sea Grant. Alaska, Fairbanks, October, 1-6, 2(8),1996.
7. Pardo, Alfonso. y Camara, Nora. *Mareas Rojas, la rebelión del plancton*. Editorial Inmersión, Zaragoza, 2004. pp. 54-60.
8. Instituto de Salud de la República de Chile. Página consultada el día 25 de Febrero de 2007. http://www.ispch.cl/actualidad/articulos/MAREA_ROJA.pdf
9. Botana, Luis. *Seafood and Freshwater toxins. Pharmacology. Physiology and detection*. Published by Marcel Dekker. Inc. New York, 2000. pp. 125-130.

10. Ofelia Saldate Castañeda, José Luis Vázquez Castellanos, Jovita Galván, Aurora Sánchez Anguiano y Austreberta Nazar. *Intoxicaciones por Toxina Paralizante de Molusco en Oaxaca*. Salud Pública, 33:240-247; 1991.
11. Martha L. Hernández-Orozco, Ismael Gárate-Lizárraga. *Síndrome de Envenenamiento Paralizante por Consumo de Moluscos*. Revista Biomédica, 17:45-60; 2006.
12. E.F. Mc. Farren, H. Tanabe, F.J. Silva, W. B. Wilson, J. E. Campbell and K. H. Lewis. *The occurrence of a Ciguatera-Like poisson in Oysters, Clams and Gymnodinium Breve Cultures*. Pergamon Press Ltd. Printed in Great Britain, 3(3):111-123; 1965.
13. M. Anderson, Donald. *Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters*. Biology Department. Canada, Vancouver, 2001, pp. 29-35.
14. Kodama, Masaaki. *PSP, Ecobiology, Classification, and Origin*. Kitesato University. Canada, Ottawa, 2002. pp. 125-153.
15. Ronel Biré. Sophie Kryss, Jean – Marc Frémy and Sylviane Dragacci. *Improved Solid-Phase Extraction Procedure in the Analisis of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*. Published by Journal Agricultural and Food Chemistry, 28:6386-6390; 2003.
16. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, Informe 1995-2000, Profepa, Semarnat, México, 2000. Semarnat, Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, México D. F, 2002.
17. Norma Oficial Mexicana. NOM-031-SSA1-1993, Bienes Y Servicios. “Productos de la Pesca. Moluscos Bivalvos Frescos-refrigerados y Congelados. Especificaciones Sanitarias”.
18. Horwitz, William. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Published by The Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 2000. pp 881-882.
19. Institute for Marine Biosciences. PSP Supplemental Information. pp. 1-6.